

Aus der Klinik für Pädiatrie m.S. Onkologie/Hämatologie
Otto-Heubner-Centrum für Kinder- und Jugendmedizin
(Direktor: Prof. Dr. med. G. Henze)
der Medizinischen Fakultät Charité
der Humboldt-Universität zu Berlin

DISSERTATION

Identifizierung und Charakterisierung einer alternativ
gespleißten mRNA der Interleukin-4 Rezeptor alpha-Kette und
Untersuchung der biologischen Funktion der verkürzten
Rezeptorvariante

Zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät Charité
der Humboldt-Universität zu Berlin

von
Anja Möricke
aus Berlin

Dekan: Prof. Dr. med. Dr. h. c. R. Felix

Gutachter: 1. Prof Dr. med. Dr. h. c. G. Henze
 2. Prof. Dr. med. K. Welte
 3. PD Dr. med. Chr. Schmidt

Datum der Promotion: 25.01.2002

ZUSAMMENFASSUNG

Alternatives mRNA-Splicing ist ein häufig beobachtetes Phänomen, das es der Zelle ermöglicht, unterschiedliche Proteine aus einem Gen zu generieren. In den letzten Jahren wurden immer mehr alternativ gespleißte Transkripte entdeckt, und einigen der daraus resultierenden Protein-Isoformen konnten geänderte biologische Funktionen zugeordnet werden.

In dieser Arbeit ist erstmals ein alternativ gespleißtes Transkript der Interleukin-4 Rezeptor alpha (IL-4R α) Kette beschrieben. Dieser mRNA Splice-Variante, genannt IL-4R α_{IT} , fehlt im membranproximalen Bereich der zytoplasmatischen Domäne ein komplettes Exon. Dies führt zur Verschiebung des Leserasters und so zur Entstehung eines vorzeitigen Stop-Codons. Der resultierenden Protein-Isoform fehlt der größte Teil der intrazellulären Kette mit den dort enthaltenen, für die Signaltransduktion essentiellen Domänen.

Die Untersuchung der biologischen Funktion der Rezeptor-Varianten in einem geeigneten Zellsystem der Maus zeigte, daß die Splice-Variante IL-4R α_{IT} keine Proliferation der Zellen vermitteln und auch den Übergang der Zellen in die Apoptose nicht verhindern kann.

Bei der Quantifizierung der Expression von IL-4R α_{IT} -mRNA in Relation zum IL-4R α voller Länge mit einer kompetitiven RT-PCR an Knochenmark und peripheren Blutlymphozyten von Kindern mit ALL zeigte sich zunächst ein irreführender Unterschied zwischen Proben von Kindern mit ALL-Ersterkrankung und Rezidiv. Weitere Untersuchungen ergaben jedoch, daß der Zeitraum zwischen Abnahme und Aufarbeitung des Untersuchungsmaterials für diesen scheinbaren Zusammenhang verantwortlich war. Während direkt nach Abnahme aufgearbeitetes Untersuchungsmaterial eine nur niedrige relative Expression der Splice-Variante zeigte, nahm diese bei verzögerter Aufarbeitung drastisch zu. Diese Beobachtung wurde experimentell an Proben gesunder Probanden wiederholt bestätigt.

Interessanterweise konnte derselbe Effekt in unterschiedlicher Ausprägung auch bei Splice-Variante anderer Zytokine und –Rezeptoren wie IL-7, IL-7R und β_C beobachtet werden. mRNA-Stabilitäts-Assays und die Bestimmung der einzelnen Transkripte mit einer semiquantitativen RT-PCR zeigten, daß es tatsächlich zu einer absoluten Hochregulation der IL-4R α_{IT} -mRNA in den verzögerte aufgearbeiteten Proben kommt. Wurden die Zellen wieder in Kultur genommen, war dies innerhalb weniger Stunden reversibel. Desweiteren scheinen auch unterschiedlichen mRNA-Stabilitäten eine Rolle zu spielen.

Schlagworte: Interleukin-4 Rezeptor, alternatives Splicing, mRNA-Stabilität, akute lymphoblastische Leukämie

ABSTRACT

Alternative pre-mRNA splicing is a widespread mechanism contributing to the diversity of gene expression. The number of newly detected alternatively spliced transcripts has continuously risen, and distinct biological functions have been attributed to some protein isoforms resulting from these mRNA variants.

We report on the detection of a novel alternatively spliced transcript of the human interleukin-4 receptor alpha (IL-4R α) chain, which has been called IL-4R α_{IT} mRNA. A premature stop codon due to omission of one exon in the membrane-proximal region of the cytoplasmic domain leads to an mRNA variant, which encodes an intracellular truncated receptor protein lacking domains which are essential for signal transduction.

The investigation of the biological function of the IL-4R α splice variants in a suitable mouse cell system showed, that the truncated receptor variant is not able to mediate cell proliferation or prevention of apoptosis.

Bone marrow and peripheral blood samples from children with acute lymphoblastic leukemia were analyzed for the expression of IL-4R α_{IT} mRNA relative to the full-length receptor transcript by competitive RT-PCR. Initially, there was found a difference of IL-4R α_{IT} mRNA expression in patients with initial ALL versus relapsed ALL. However, this difference turned out to be due to the time interval between collection and preparation of samples. While freshly isolated material was associated with low levels of IL-4R α_{IT} mRNA, samples with a longer period until cell preparation exhibited a drastic increase of IL-4R α_{IT} mRNA levels. The same results were obtained for peripheral blood samples from healthy donors by imitating a prolonged time of transport until cell preparation. Interestingly, a similar effect could be demonstrated for splice variants of other cytokine receptors and cytokines (β_C , IL-7R, and IL-7), although to different extents. mRNA stability assays and semiquantitative RT-PCR specific for IL-4R α or IL-4R α_{IT} , respectively, indicated that the expression of IL-4R α_{IT} mRNA increases absolutely in these samples, although mRNA degradation may be of importance as well.

Keywords: Interleukin-4 receptor, alternative splicing, mRNA stability, akute lymphoblastic leukemia

INHALTSVERZEICHNIS

1	Einleitung	13
1.1	Interleukin-4	13
1.2	Interleukin-4 Rezeptor	15
1.2.1	Aufbau des Interleukin-4 Rezeptors	15
1.2.2	Prinzipien der Signaltransduktion über den IL-4R	16
1.2.3	Funktionelle Domänen des IL-4R	19
1.3	RNA Splicing	20
1.3.1	Konstitutives Splicing	20
1.3.1.1	Intron-Konsensus-Sequenzen, Splicing Elemente im Intron	20
1.3.1.2	Mechanismus des RNA Splicing	21
1.3.1.3	SR-Proteine	22
1.3.1.4	Interaktionen der SR-Proteine im Spliceosom	23
1.3.1.5	Regulation von SR-Proteinen	24
1.3.2	Alternatives Splicing	24
1.3.2.1	Regulation von alternativem Splicing, Rolle der SR-Proteine	25
1.3.2.2	Alternatives Splicing bei Zytokin-Rezeptoren	27
2	Fragestellung	30
3	Material und Methoden	32
3.1	Patientenproben und Zelllinien	32
3.1.1	Patienten	32
3.1.2	Zelllinien	32
3.2	Material	33
3.2.1	Chemikalien	33
3.2.2	Puffer und Lösungen	34
3.2.3	Gele	34
3.2.4	Medien für die Zell-/Bakterienkultur	35
3.2.5	Nukleinsäuren/Nukleotide	35
3.2.6	Klonierung	36
3.2.7	Zytokine	36
3.2.8	Nukleinsäureextraktion	36
3.2.9	Enzyme	36
3.2.9.1	Restriktionsendonukleasen	36
3.2.9.2	DNA-Polymerasen	36
3.2.9.3	Weitere Enzyme	36

3.2.10	Antikörper.....	37
3.2.11	Sequenzierung.....	37
3.2.12	RNase-Protection-Assay.....	37
3.2.13	Zellproliferation.....	37
3.2.14	Software.....	37
3.2.15	Geräte.....	37
3.3	Statistische Auswertung.....	39
3.4	Allgemeine Methoden.....	39
3.4.1	Zellkultur.....	39
3.4.2	Isolierung der mononukleären Zellen.....	39
3.4.3	RNA/DNA-Extraktion.....	39
3.4.4	Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR), Reverse Transcription PCR (RT-PCR).....	40
3.4.4.1	cDNA-Synthese.....	42
3.4.4.2	Agarose-Gelelektrophorese.....	42
3.4.5	Aufreinigung von PCR-Produkten.....	42
3.4.6	Sequenzierungen.....	42
3.4.6.1	Cycle-Sequencing.....	42
3.4.6.2	Polyacrylamid-Gelelektrophorese.....	43
3.4.7	Restriktionsverdau.....	43
3.4.8	Single Stranded Conformational Polymorphism (SSCP) Analyse.....	44
3.4.9	Durchflußzytometrie.....	44
3.4.10	Klonierung.....	45
3.4.10.1	Unidirektionales TA-Cloning.....	45
3.4.10.2	Phosphorylierung eines Primers.....	46
3.4.10.3	Transformation kompetenter E. coli.....	46
3.4.10.4	Plasmidpräparationen.....	46
3.5	Identifizierung und Charakterisierung der IL-4R α Splice-Variante (IL-4R α_{IT}).....	47
3.5.1	PCR.....	47
3.5.2	Sequenzierung.....	47
3.5.3	SSCP.....	47
3.5.4	Quantitative Analyse.....	48
3.5.5	Identifizierung der Grenzen des alternativ gespleißten Exons.....	48
3.5.5.1	PCR.....	48
3.5.5.2	Sequenzierung.....	49
3.5.6	mRNA-Stabilitäts-Test.....	49
3.5.6.1	Kompetitive RT-PCR.....	49
3.5.6.2	Semiquantitative RT-PCR.....	49

3.6	Klonierung von IL-4R α - und IL-4R α_{IT} -cDNA	50
3.6.1	PCR zur Herstellung der Inserts	50
3.6.1.1	Externe PCR.....	51
3.6.1.2	Interne PCR.....	52
3.6.2	Ligation	52
3.6.3	Transformation kompetenter E. coli-Stämme	53
3.6.4	Sequenzierung.....	53
3.6.5	Herstellung von pCR3.1/IL-4R α mit korrektem Insert.....	53
3.6.6	Plasmidpräparationen (Maxipreps).....	54
3.7	Transfektion der Zelllinie Ba/F3.....	54
3.8	Durchflußzytometrische Untersuchung der Expression von IL-4R und IL-4R α_{IT}	54
3.9	Proliferations-Assays	55
3.9.1	Prinzip des MTS Zell-Proliferations-Test	55
3.9.2	Durchführung des MTS Zell-Proliferations-Test	55
3.9.3	Proliferation nach Zugabe von spezifischem Antikörper gegen hIL-4R α	55
3.10	Durchflußzytometrische Detektion apoptotischer Zellen	55
3.11	RNase-Protection-Assay	56
3.11.1	In vitro-Transkription der Fluorescein-markierten RNA-Sonde	57
3.11.2	RNase Protection	59
3.11.3	Gene Scan	59
4	Ergebnisse.....	60
4.1	Identifizierung der IL-4R α_{IT} mRNA.....	60
4.2	Untersuchung der Expression der IL-4R α_{IT} mRNA an Patientenmaterial.....	65
4.3	Untersuchung der mRNA-Stabilität von IL-4R α und IL-4R α_{IT}	70
4.4	Semiquantitative RT-PCR der mRNA von IL-4R α und IL-4R α_{IT}	73
4.5	Reversibilität der Zunahme der Expression von IL-4R α_{IT}	74
4.6	Biologische Funktion von IL-4R α_{IT}	75
4.6.1	Transfektion von Ba/F3 mit pCR3.1-Uni, pCR3.1/IL-4R α und pCR3.1/IL-4R α_{IT} ..	76
4.6.2	Nachweis der Expression von IL-4R α und IL-4R α_{IT}	76
4.6.3	Proliferationsassays.....	78
4.6.4	Apoptose der transfizierten Zellen unter IL-4-Stimulation.....	81
5	Diskussion	85
5.1	Probleme der Methoden	85
5.1.1	Kompetitive und semiquantitative RT-PCR	85
5.1.2	RNase Protection Assay	88

5.2	Charakterisierung der Splice-Variante IL-4R α_{IT}	89
5.3	Funktion von IL-4R α_{IT}	91
5.4	Expression von IL-4R α_{IT} in Material von Patienten mit ALL	92
5.5	Expression von IL-4R α_{IT} bei verzögerter Probenaufarbeitung.....	94
5.5.1	mRNA-Degradation von IL-4R α und IL-4R α_{IT}	94
5.5.2	Zunahme der Expression von IL-4R α_{IT}	95
5.5.3	Problem der verzögerten Probenaufarbeitung bei multizentrischen Studien.....	99
6	Zusammenfassung	100
7	Abkürzungen.....	102
8	Referenzen	103
9	Anhang	116
9.1	mRNA- und Protein-Sequenz von IL-4R α /IL-4R α_{IT}	116
9.2	Lebenslauf	119
9.3	Danksagung.....	120

ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abb. 1	Signaltransduktion über den IL-4R (1): Durch Heterodimerisierung der Rezeptoruntereinheiten nach Bindung von IL-4 kommt es zur Autophosphorylierung und Aktivierung der Januskinasen.	17
Abb. 2	Signaltransduktion über den IL-4R (2): Wahrscheinlich sind die Januskinasen auch für die Phosphorylierung des I4R-Motivs verantwortlich. Hier kann dann 4PS/IRS2 koppeln, das dann nach Phosphorylierung durch die Januskinasen diverse andere Signalmoleküle bindet. Dieser Weg führt über weitere, noch weitgehend ungeklärte Mechanismen zur Proliferation der Zelle.	18
Abb. 3	Signaltransduktion über den IL-4R (3): Die aktivierten Januskinasen phosphorylieren zwei Tyrosinreste im C-terminalen Bereich des Rezeptors. Dadurch entsteht eine Bindungsstelle für STAT6. STAT6 wird seinerseits durch die Januskinasen phosphoryliert und transloziert als Homodimer in den Zellkern, wo es an die Promotoren der dargestellten Gene bindet.	18
Abb. 4:	Konsensus-Sequenzen der 5'- und 3'-splice site des Introns.	21
Abb. 5	Schematische Darstellung der Entstehung unterschiedlicher reifer mRNAs aus einer gemeinsamen precursor-mRNA. In A ist der „normale“ Splicing-Vorgang dargestellt, in B ist ein vollständiges Exon ausgelassen worden („exon skipping“), in C verbleibt in der mRNA ein vollständiges Intron, in D und E werden alternative splice sites innerhalb des Exons genutzt, so daß Teile des Exons ausgelassen werden, und in F kommt es zur alternativen Nutzung zweier unterschiedlicher Exons.	25
Abb. 6	Beispiele für Strukturen unterschiedlicher mRNA Splice-Varianten. Bei den Varianten B und C kommt es durch eine Verschiebung des Leserasters zur Entstehung eines vorzeitigen in frame-Stop-Codons, bei den Varianten D und E enthält ein zusätzliches Exon ein Stop-Codon. Die Variante F enthält zusätzliche Nukleotide, die für eine Protease-sensitive Region kodieren. Die mRNA in A kodiert für den Rezeptor voller Länge, aus den Varianten B, E und F resultieren lösliche Rezeptoren und aus den Varianten C und D membranständige Rezeptoren mit mehr oder weniger verkürzten intrazellulären Domänen.	28
Abb. 7	Schematische Darstellung des unidirektionalen TA-Cloning-Vektors für die gerichtete Ligation des PCR-Produktes mit dem Vektor. Da die Ligase ein phosphoryliertes 5'-Ende für die Ligation benötigt, ist bei Dephosphorylierung eines Armes des Vektors und Phosphorylierung eines der beiden Enden des PCR-Produktes die Ligation nur in einer Richtung möglich.	45
Abb. 8	Prinzip des RNase-Protection-Assays (Erläuterung siehe Text).	57

Abb. 9	Entstehung der beiden Fragmente von 310 und 75 nt bei RNase-Protektion der Sonde durch IL-4R α_{IT} -mRNA. Der Bereich der Sonde, der der Sequenz des „Exon x“ komplementär ist, bindet nicht an die IL-4R α_{IT} -mRNA und wird daher von der RNase verdaut (siehe auch Abb. 10)	57
Abb. 10	Schematische Darstellung der RPA-Sonde. Nach Schneiden des Vektors mit EcoRI kann ein Fragment von 481 nt in vitro-transkribiert werden. Das durch die IL-4R α -mRNA geschützte Fragment hat nach Hybridisierung und RNase-Verdau eine Länge von 435 nt, von der IL-4R α_{IT} -mRNA werden zwei Fragmente von 310 und 75 nt Länge geschützt (siehe auch Abb. 9). Wird der Vektor mit der Restriktionsendonuklease Ball geschnitten, entsteht nach in vitro-Transkription ein Fragment von 193 nt. Dieses und das 481 nt lange Fragment wurden als Größenmarker eingesetzt.	59
Abb. 11	RT-PCR zur Amplifizierung von IL-4R α -cDNA. Dargestellt sind 6 Proben (PB oder KM) von Patienten mit ALL, bei denen sich zusätzlich zu der erwarteten Bande ein weiteres, 50 bp kürzeres Produkt in sehr unterschiedlicher Intensität nachweisen läßt. Auf die Entstehung der als Heteroduplexe bezeichneten Bande wird weiter unten eingegangen.....	60
Abb. 12	Elektropherogramm der Sequenzierungen der PCR-Fragmente von IL-4R α und IL-4R α_{IT} . Der Pfeil bezeichnet in der Splice-Variante IL-4R α_{IT} die Stelle, an welcher im Vergleich zur vollständigen IL-4R α -cDNA 50 bp fehlen.	61
Abb. 13	mRNA-Struktur von IL-4R α und IL-4R α_{IT} : Durch Auslassen des Exon x kommt es zur Verschiebung des Leserasters und zur Entstehung eines in frame-Stop Codons. Die schwarzen Pfeile bezeichnen die IL-4R α -spezifischen Primer IL-4R 617 up/IL-4R 1118 down (Tab. 1); SP: Signalpeptid; EX: extrazelluläre Domäne; TM: transmembranöse Domäne; CYTO: zytoplasmatische Domäne; STOP: Stop-Codon.	61
Abb. 14	Sequenzvergleich des alternativ gespleißten Exon x der humanen IL-4R α -mRNA mit dem korrespondierenden Exon 11 der Maus (Homologie 74%).	62
Abb. 15	Lokalisation der Primerpaare IL-4R 950 up/IL-4R 1074 down und IL-4R 1030 up/IL-4R 1118 down zur Amplifizierung der an das „Exon x“ angrenzenden Introns der IL-4R α -DNA.....	62
Abb. 16	Region des alternativ gespleißten Exon x der IL-4R α -mRNA (oben) und den angrenzenden Introns der genomischen DNA (unten). Die DNA-Sequenz der Exon-Intron-Grenzen ist unten aufgeführt. Exon-Sequenzen sind unterstrichen, die donor und acceptor splice sites sind fett gedruckt.....	63

- Abb. 17 A: Potentielle Proteinstruktur von IL-4R α_T (rechts) im Vergleich zum vollständigen IL-4R α (links). Die schwarze Box stellt die Homologie-Box 1 dar, die in IL-4R α_T erhalten ist, die schraffierte Box entspricht dem durch die Verschiebung des Leserasters veränderten C-terminalen Ende von 21 Aminosäuren. EX: extrazelluläre; TM: transmembranöse; CYTO: cytoplasmatische Domäne. GLU: Glutaminsäurereiche Region. Die Abbildung zeigt, daß alle Tyrosinreste und die für die Proliferation essentielle glutaminreiche Region in IL-4R α_T fehlen. B: Potentielle Aminosäuresequenzen von IL-4R α_T und IL-4R α . Der Pfeil bezeichnet den Beginn der durch die Verschiebung des Leserasters geänderten Sequenz.64
- Abb. 18 SSCP-Analyse der PCR-Produkte von IL-4R α und IL-4R α_{IT} zum Nachweis der Heteroduplex-Bande. Da die Heteroduplexe aus Einzelsträngen von IL-4R α und IL-4R α_{IT} bestehen, zeigt sich auch ein Bandenmuster, das sich aus den Banden von IL-4R α und IL-4R α_{IT} zusammensetzt.65
- Abb. 19 Profilanalyse zur Quantifizierung der Banden bei vier verschiedenen Patientenproben. Die grau getönten Flächen entsprechen den AUC's für IL-4R α und IL-4R α_T . Die Werte für die sAUC(IL-4R α_T) machen die sehr unterschiedliche Expression der Splice-Variante bei verschiedenen Patientenproben deutlich. Bei der zusätzlichen Bande zwischen den Banden von IL-4R α und IL-4R α_T handelt es sich um Heteroduplexe, die aufgrund der Ähnlichkeit der Amplifikate von IL-4R α und seiner Splice-Variante entstehen. Dies wurde durch eine SSCP(single stranded conformational polymorphism)-Analyse (siehe auch Abb. 18 und Abschnitt 4.1) nachgewiesen.66
- Abb. 20 Boxplots zum Vergleich unterschiedlicher Untersuchungsmaterialien jeweils derselben Patienten: Sowohl beim Vergleich von Blut mit KM zum Zeitpunkt der Diagnose (A) als auch von KM bei Diagnose mit Remissionsmark (B) zeigt die statistische Auswertung keinen signifikanten Unterschied.67
- Abb. 21 Vergleich der Expression von IL-4R α_T , ausgedrückt als sAUC(IL-4R α_T), in Proben von Patienten mit Ersterkrankung mit einer Gruppe von Rezidivpatienten, dargestellt in Boxplots.67
- Abb. 22 Expression von IL-4R α_T mRNA im Verhältnis zu IL-4R α bei Aufarbeitung von mononukleären Zellen derselben Blutprobe direkt nach Abnahme oder 2 bzw. 4 Tage später: Der Anteil der Expression von IL-4R α_T ist umso größer, je länger der Zeitraum zwischen Abnahme und Aufarbeitung der Proben war.68

- Abb. 23 Einfluß der Temperatur auf die Expression von IL-4R α_T bei verzögerter Aufarbeitung. Bei Kühlung der Proben ist der Effekt der Zunahme der sAUC(IL-4R α_T) weniger ausgeprägt.69
- Abb. 24 Vergleich unterschiedlich langer Transportzeiten des Untersuchungsmaterials. Deutlicher Anstieg der Expression der IL-4R α_T bei längeren Transportzeiten. In A stammt das untersuchte Material (Blut oder KM) von Patienten mit Ersterkrankungen oder Rezidiven, in B wurden nur Rezidivpatienten, in C nur Patienten mit Ersterkrankung eine ALL ausgewertet.....70
- Abb. 25 Stabilität der mRNA von IL-4R α und IL-4R α_T . Bei Hemmung der Transkription mit Actinomycin D zur Beurteilung der Degradierung der beiden mRNA-Varianten zeigt sich bei verzögerter Aufarbeitung der Zellen ebenfalls eine Zunahme der sAUC(IL-4R α_T). 70
- Abb. 26 Vergleich der Proben mit und ohne Hemmung der Transkription. Bei den Proben mit Actinomycin D zeigen sich nach verzögerter Aufarbeitung deutlich höhere Werte für die sAUC(IL-4R α_T) (B+D) als bei den Proben ohne Transkriptionshemmung (C+E). ..71
- Abb. 27 Expression von Splice-Varianten anderer Interleukine oder Interleukin-Rezeptoren in mononukleären Zellen eines gesunden Probanden, die mit oder ohne Hemmung der Transkription entweder direkt oder erst 2 bzw 4 Tage nach Abnahme aufgearbeitet wurden. Die Zunahme der sAUC der Splice-Varianten ist sehr unterschiedlich ausgeprägt. Regelmäßig ist die Zunahme unter Actinomycin D geringer oder gar nicht nachweisbar. Die in der Probe „Tag 4 ohne Actinomycin D“ nachweisbare zusätzliche Bande der γ_C ist in der veröffentlichten Literatur bisher nicht beschrieben. Vermutlich handelt es sich hier ebenfalls um das Amplifikat eines alternativ gespleißten Transkriptes mit zusätzlicher typischer Heteroduplex-Bande.....72
- Abb. 28 Lokalisation der in der semiquantitativen RT-PCR eingesetzten, jeweils für IL-4R α und IL-4R α_T spezifischen Primerpaare. IL-4R 1030 up sitzt im „Exon x“, das in IL-4R α_T fehlt, und kann daher nur IL-4R α -cDNA amplifizieren, IL-4R 1089IT down überspannt die Grenze der beiden dem „Exon x“ benachbarten Exons und ist daher spezifisch für IL-4R α_T -cDNA.....73
- Abb. 29 Bestimmung der Expressionsunterschiede von IL-4R α und IL-4R α_T bei verzögerter Aufarbeitung der Zellen mit und ohne Hemmung der Transkription. Dargestellt ist die Auswertung der semiquantitativen PCR mit jeweils für die beiden Transkripte spezifischen Primern zur Beurteilung der relativen Expressionsunterschiede von IL-4R α bzw. IL-4R α_T zwischen den Proben. Während in den Proben mit Hemmung der Transkription beide Transkripte abnehmen, zeigt sich in den Proben ohne Actinomycin D eine Hochregulation von IL-4R α_T . Die gemessenen O.D. der einzelnen

Banden von IL-4R α bzw. IL-4R α_T jeder Probe sind in Bezug zur O.D. der Bande für GAPDH derselben Probe gesetzt worden. Zum anschaulicheren Vergleich der Proben wurden die ermittelten Werte am Tag 0 auf 100% Prozent gesetzt.	74
Abb. 30 Reversibilität der Zunahme der sAUC(IL-4R α_T) nach Kultivierung der Zellen. Werden mononukleäre Zellen, die die IL-4R α_T -mRNA nach einigen Tagen Stehen bei Zimmertemperatur relativ stark exprimieren, wieder in Kultur genommen, nimmt innerhalb weniger Stunden die sAUC(IL-4R α_T) wieder deutlich ab (A). Die semiquantitative Bestimmung der Einzeltranskripte zeigt, daß die mRNA von IL-4R α_T in diesen Zellen wieder herunterreguliert wird. Bei zusätzlicher Stimulation mit Concanavalin A oder IL-4 werden im Vergleich zu den Zellen ohne zusätzliche Stimulation beide Transkripte stärker exprimiert (B).	75
Abb. 31 Nachweis der Integration der gesamten kodierenden Sequenz der DNA (oben) bzw. Expression der mRNA (unten) von IL-4R α und IL-4R α_T in den transfizierten Ba/F3-Zellen mittels PCR bzw. RT-PCR exemplarisch für einige Klone. Die in der PCR oben dargestellte zusätzliche kürzere Bande von ca. 340 bp ließ sich in der RT-PCR nicht beobachten, war aber auch in den untransfizierten Ba/F3-Zellen nachweisbar (nicht dargestellt) und stellt vermutlich ein unspezifisches Produkt aus dem Maus-eigenen Genom dar.....	77
Abb. 32 RNase-Protection-Assay zum Nachweis der Expression der IL-4R α - und IL-4R α_T -mRNA in den mit pCR3.1/IL-4R α und pCR3.1/IL-4R α_T transfizierten Ba/F3-Zellen, exemplarisch dargestellt für je einen Zellklon.....	77
Abb. 33 Durchflußzytometrischer Nachweis der Expression von IL-4R α und IL-4R α_T auf der Zelloberfläche der transfizierten Zellen exemplarisch für drei Klone. Der ausgefüllte Peak entspricht der Isotypkontrolle. Das Histogramm ganz rechts zeigt die fehlende Expression auf den mit dem leeren Vektor transfizierten Zellen.	78
Abb. 34 Proliferationsverhalten der mit der vollständigen IL-4R α -Kette (oben), mit der Splice-Variante IL-4R α_T (Mitte) und der mit dem leeren Vektor pCR3.1-Uni (links) transfizierten Ba/F3-Zellen unter Stimulation mit hIL-4 im Vergleich zu mIL-4 (4 ng/ml) über 42-48 Stunden. Mit Ausnahme eines Klones (Pfeil) proliferierten unter hIL-4 alle mit IL-4R α transfizierten Klone, größtenteils stärker als unter mIL-4, während die mit der Splice-Variante und erwartungsgemäß auch die mit dem leeren Vektor transfizierten Zellen unter hIL-4 kein Wachstum zeigten.	79
Abb. 35 Messung der Proliferation der mit IL-4R α , IL-4R α_T oder dem leeren Vektor transfizierten Ba/F3-Zellen unter Stimulation mit mIL-4 und hIL-4 in unterschiedlichen Konzentrationen exemplarisch für je einen Zellklon. Alle Klone proliferierten wie erwartet	

konzentrationsabhängig unter mIL-4. Der mit dem vollständigen hIL-4R α transfizierte Klon zeigt unter hIL-4 ebenfalls Wachstum, während der mit der Splice-Variante und der mit dem leeren Vektor transfizierte Zellklon unter hIL-4 nicht proliferierten. Dargestellt sind jeweils die gemittelten Werte aus drei Messungen.....	80
Abb. 36 Hemmung der hIL-4-vermittelten Proliferation eines mit dem vollständigen hIL-4R α transfizierten Ba/F3-Zellklones durch einen für den hIL-4R α spezifischen monoklonalen Antikörper. Der Antikörper hemmt nicht die über den mIL-4R vermittelte Proliferation durch mIL-4.	81
Abb. 37 Messung der Apoptose der mit IL-4R α (A), IL-4R α_T (B) bzw. dem leeren Vektor (C) transfizierten Zellklone nach Kultur in wachstumsfaktorfreiem Medium oder unter Stimulation mit humanem oder murinem IL-4 über 24 h. Dargestellt sind jeweils die Färbung mit Propidiumjodid als Histogramme und die dazugehörige Zweiparameter-Darstellung der Markierung mit Annexin-V-FITC gegen die Propidiumjodid-Färbung. Beide Darstellungen geben prinzipiell dieselbe Aussage wieder. Der Anteil der apoptotischen Zellen des mit IL-4R α transfizierten Zellklones entspricht unter hIL-4 etwa dem Anteil unter mIL-4, während ohne Wachstumsfaktor zu dem Zeitpunkt ein sehr viel größerer Anteil der Zellen apoptotisch ist. Sowohl in den mit IL-4R α_T als auch bei den mit dem leeren Vektor transfizierten Zellen kann durch hIL-4 die Auslösung der Apoptose in den Zellen nicht verhindert werden. Der Anteil der apoptotischen Zellen ist unter hIL-4 deutlich größer als unter mIL-4 und damit genauso hoch wie ohne Wachstumsfaktor.....	83
Abb. 38 Zusammenfassende graphische Darstellung der Untersuchung des Anteils apoptotischer Zellen unter Stimulation mit hIL-4, mIL-4 oder ohne Wachstumsfaktor. Zur Erläuterung siehe Abb. 37.....	84
Abb. 39 Verteilung der Patienten mit Ersterkrankung oder Rezidiv auf die Transportzeit des Untersuchungsmaterials. Jeder Strich der „Sonnenblumen“ steht für eine ausgewertete Probe. An der Y-Achse ist die Transportzeit in Tagen aufgetragen.....	94

1 EINLEITUNG

1.1 Interleukin-4

Interleukin-4 (IL-4) wurde im Jahre 1982 in seiner Eigenschaft identifiziert, die polyklonale Proliferation kostimulierter B-Zellen von Mäusen zu induzieren [1]. Nach der Klonierung von humaner IL-4 cDNA [2] konnte gezeigt werden, daß es darüber hinaus über ein weites Spektrum biologischer Effekte auf hämatopoietische und nicht-hämatopoietische Zellen verfügt. So hat es wachstumsfördernde Wirkungen auf T-Zellen [3], Endothelzellen [4] und Fibroblasten [5] und spielt eine kritische Rolle bei der Reifung von B-Zellen zu Immunglobulin-seziernden Plasmazellen durch die Induktion des Immunglobulin-klassenwechsel von IgM zu IgG1 und IgE [6, 7, 8]. Desweiteren ist es wichtig für die Expression des niedrig-affinen IgE-Rezeptors CD23 [9, 10], von MHC-Klasse II [11, 12] und von Oberflächen-IgM [13] auf B-Zellen. In seiner Eigenschaft als Faktor für die Differenzierung von T-Helfer-(Th)-0-Vorläuferzellen zu Th2-Zellen trägt es zur Entwicklung einer humoralen Immunantwort bei [14, 15, 16].

Durch Studien an CD4⁺ T-Helfer-Zellen von Mäusen konnte gezeigt werden, daß sich basierend auf deren Muster der Zytokin-Synthese zwei Zelltypen unterscheiden lassen: Th1-Zellen sezernieren IL-2 und IFN- γ , Th2-Zellen dagegen IL-4, IL-5, IL-10 [17]. Ähnlich polarisierte T-Zell Untergruppen lassen sich auch beim Menschen beobachten [18], obwohl hier die Grenzen zwischen Th1- und Th2-Zellen nicht immer leicht gezogen werden können. Inzwischen ist deutlich geworden, daß es viele Überlappungen zwischen den Subpopulationen gibt und Zytokin-Muster gesehen werden, die sich keinem bekannten Phänotyp eindeutig zuordnen lassen. Ob diese beobachtete Vielfalt unterschiedliche Stadien der Zellentwicklung oder transiente Antworten auf Immunstimuli widerspiegelt oder ob es sich um eine nicht zu überblickende Menge an definierten Phänotypen handelt, konnte bisher nicht in letzter Konsequenz geklärt werden. Dennoch läßt sich diversen Immunreaktionen eine definierte Th1- oder Th2-Zellantwort mit streng korrelierender Zytokin-Produktion zuordnen, was die Th1-Th2-Dichotomie auch weiterhin als eine sinnvolle funktionelle Einteilung erscheinen läßt [19].

Während die Th1-Zellen ihre Aufgaben vor allem in der zellvermittelten Immunität haben, sind die Th2-Zellen vornehmlich in die humorale Immunantwort involviert. Sie antworten auf Antigene, die von B-Zellen präsentiert werden, fördern die Sekretion von Antikörpern, insbesondere von IgE, und unterstützen Proliferation und Funktion von Mastzellen und Eosinophilen [19].

Viele der Th2-assoziierten Eigenschaften werden durch die oben dargestellten biologischen Funktionen von IL-4 vermittelt. So spielt IL-4 auch in der Pathogenese verschiedener Erkrankungen eine wichtige Rolle. Als Beispiel sei der Zusammenhang von inadäquater IL-4-Produktion bzw. dessen Wirkung über den IL-4R mit atopischen Erkrankungen genannt. Einer der bekannten Polymorphismen im Promoter des IL-4-Genes führt zu hoher Transkriptionsaktivität und Überexpression von IL-4 [20]. Für den IL-4R sind bisher zwei Polymorphismen bekannt, deren Auftreten mit erhöhter IgE-Produktion und atopischen Erkrankungen korreliert [21, 22].

Mehrere Studien weisen darauf hin, daß IL-4 einen direkten wachstumshemmenden Effekt auf leukämische Zellen haben kann [23] und daß ihm bei der immunologischen Abwehr maligner Zellen eine Bedeutung zukommt. So konnten Okabe *et al.* [24] zeigen, daß IL-4 die DNA-Synthese Ph1-positiver ALL-Blasten vom B-Zell Phänotyp supprimiert. Außerdem hemmt es dosisabhängig das Wachstum von Ph1-positiven ALL-Zelllinien. Dieser Effekt ist mit einer Hemmung der Tyrosinkinase-Aktivität assoziiert, so daß davon ausgegangen werden kann, daß es nach Bindung von IL-4 an seinen spezifischen Rezeptor über einen bis jetzt noch unbekannten Mechanismus zu einem inhibitorischen Einfluß auf die bcr-abl-Tyrosinkinase kommt.

IL-4 hemmt auch das Wachstum von Zellen der chronischen myelomonozytären Leukämie (CMML) durch Hemmung der „autokrinen“ Produktion von IL-6 oder GM-CSF [25]. Dieser Effekt ist jedoch nur in der chronischen Phase der Erkrankung wirksam, während in der akuten Phase ein direkter wachstumsstimulierender Einfluß von IL-4 überwiegt [26]. Auch bei akuten myeloischen Leukämien mit myelomonozytärer Differenzierung (M4/M5-AML) konnte in den meisten Fällen eine proliferationshemmende Wirkung von IL-4 *in vitro* beobachtet werden. Diese ändert sich allerdings nicht unter Zugabe von IL-6, so daß dieser Effekt nicht durch eine alleinige Hemmung der autokrinen IL-6-Produktion durch IL-4 erklärt werden kann [27].

Eine indirekte Wirkung auf Tumorzellen ist über eine Einflußnahme von IL-4 auf zytotoxische Zellen möglich. Bei der Aktivierung unspezifisch wirkender zytotoxischer Zellen scheint IL-4 aber im Vergleich mit IL-2 eine eher untergeordnete Rolle zu spielen. So zeigte sich in *in vitro*-Versuchen, daß CD3- NK-Zellen, vorausgesetzt ein mitogener Stimulus ist beigegeben, in Antwort auf IL-4 zwar proliferieren [28], andererseits aber die IL-2-abhängige Bildung von LAK-Zellen durch IL-4 verhindert wird [29, 30]. Die IL-4-induzierte Suppression von IL-2-vermittelter unspezifischer Zytotoxizität ist allerdings nicht wirksam bei mit IL-2 präaktivierten Zellen, die durch IL-4 sogar in ihren Funktionen verstärkt werden können. Diese scheinbar widersprüchliche Wirkung von IL-4 ist möglicherweise durch eine IL-4-vermittelte

Herunterregulierung des IL-2R auf ruhenden LAK-Vorläuferzellen bedingt, so daß ihre Proliferation und Differenzierung in Effektorzellen verhindert wird [31].

Im Gegensatz dazu weisen verschiedene Studien darauf hin, daß IL-4 in der Entwicklung antigenspezifischer zytotoxischer T-Lymphozyten eine wichtige Rolle spielt: So kommt es in gemischten Leukozytenkulturen unter IL-4 zu einer deutlichen Zunahme der antigenspezifischen zytotoxischen Aktivität gegenüber allogenen Stimulator-Zellen [26, 32]. Unter einer Kombination von IL-2 und IL-4 gelang es Kawakami *et al.* [33], aus Tumordinfiltrierenden Lymphozyten zytotoxische T-Zelllinien zu züchten. Fanslow *et al.* [34] zeigten, daß durch die Behandlung von Mäusen mit löslichem IL-4R Abstoßungsreaktionen gegenüber allogenen Transplantaten verhindert und so die Lebenszeit transplantierte Herzen verlängert werden kann. In einer von Golumbek *et al.* [35] mit Mäusen durchgeführten Studie wurden mit IL-4 transfizierte Zellen spontan entstandener Nierenzelltumoren vorwiegend T-Zell-unabhängig abgestoßen. Zusätzlich konnte gezeigt werden, daß die Tiere, welche die IL-4-transfizierten Tumoren abstießen, eine T-Zell-abhängige, systemische Immunität gegen den Primärtumor entwickelten. Diese systemische Immunität war tumorspezifisch und hauptsächlich durch CD8⁺ T-Zellen vermittelt. Grusby *et al.* [36] fanden heraus, daß T-Zell-Klone, die in Anwesenheit von IL-4 kultiviert wurden, eine höhere zytolytische Aktivität zeigten als Zellen, die nur in IL-2 kultiviert wurden. Diese in IL-4, aber nicht die in IL-2 gewachsenen Zellen, exprimierten eine Lipase, die an dem zytolytischen Prozeß beteiligt zu sein scheint.

1.2 Interleukin-4 Rezeptor

1.2.1 Aufbau des Interleukin-4 Rezeptors

IL-4 vermittelt seine biologischen Effekte durch Bindung an einen Rezeptor-Komplex, der sich aus der spezifischen IL-4 Rezeptor alpha-(IL-4R α -)Kette und einem oder eventuell auch mehreren weiteren assoziierten Proteinen zusammensetzt. Bisher bekannte Rezeptorketten, die mit IL-4R α einen funktionellen Rezeptor-Komplex bilden können, sind die gemeinsame Gamma-Kette (common gamma chain, γ_c) [37, 38], die als Rezeptorkette von verschiedenen Zytokin-Rezeptoren geteilt wird, und die kürzlich klonierten IL-13 Rezeptor-Ketten IL-13R α 1 [39, 40] und IL-13R α 2 [41].

IL-4R α ist als reife Rezeptorkette ein ~140 kDa schweres, 800 Aminosäuren (AS) langes transmembranes Glykoprotein, das IL-4 mit hoher Affinität bindet [42]. Bestimmte strukturelle Eigenschaften in der extrazellulären Domäne des Rezeptors lassen ihn der Familie der Klasse I-Zytokin-Rezeptoren zuordnen. Diese charakteristischen Strukturen sind vier in ihrer

Position konservierte, aminoterminal gelegene Cystein-Reste, die über Disulfid-Bindungen zur räumlichen Struktur des Rezeptors beitragen, zwei kanonisch angeordnete Fibronectin Typ III (Fn-III) Motive und membranproximal das sogenannte WSXWS-Motiv ("Tryptophan - Serin - beliebige Aminosäure - Tryptophan - Serin") [43]. In der dreidimensionalen Struktur bildet die Region des WSXWS-Motiv eine Art Scharnier zwischen den Fn-III-Motiven und ist entscheidend für die Bindung des Liganden an den Rezeptor. In Untersuchungen des ebenso aufgebauten IL-2R β konnte durch Mutationen einzelner Aminosäuren in dieser Region die Bindung des Liganden an den Rezeptor reduziert oder sogar aufgehoben werden [44].

Die extrazelluläre Domäne ist über eine einzelne kurze Transmembranregion mit der langen zytoplasmatischen Domäne verbunden, deren Sequenz weniger konserviert ist als die der Extrazellulärregion. Einige Motive haben jedoch durch ihre Homologie mit funktionell bedeutsamen Domänen anderer Rezeptoren besondere Aufmerksamkeit auf sich gezogen. Dazu gehört die sogenannte Homologie-Box 1, ein kurzes Prolin-reiches Motiv, das membranproximal innerhalb der ersten 20 Aminosäuren (AS) gelegen ist. Ungefähr 100 AS weiter carboxy-terminal findet sich eine Sequenz, die durch ihren Reichtum an Glutaminsäure-Resten auffällt. Eine weitere Struktur ist das sogenannte I4R-(Insulin Rezeptor/IL-4R-)Motiv, das enge Homologie mit einem Motiv der Rezeptoren für Insulin und IGF (Insulin-like growth factor) 1 zeigt. Es enthält einen einzelnen Tyrosinrest an Position 497. Drei weitere Tyrosinreste lassen sich in der distalen Region der Rezeptorkette an den Positionen 575, 603 und 631 finden.

Diese und wahrscheinlich noch weitere bisher nicht identifizierte Domänen tragen zu dem Prozeß der Signalübermittlung durch den IL-4R bei. Zur Charakterisierung der Bedeutung dieser Motive und zur Identifizierung weiterer funktionell wichtiger Domänen wurden Deletions- und Mutationskonstrukte des Rezeptors auf ihre Fähigkeit analysiert, verschiedene Bereiche der Signaltransduktion wie Proliferation, Inhibition von Apoptose oder Differenzierung vermitteln zu können. Der Vorgang der Signaltransduktion und die Beteiligung dieser Domänen daran soll im Folgenden vereinfacht und auf die wesentlichen bekannten Mechanismen beschränkt dargestellt werden.

1.2.2 Prinzipien der Signaltransduktion über den IL-4R

Ein wichtiges Merkmal aller Klasse-I-Zytokin-Rezeptoren ist das Fehlen einer intrinsischen Tyrosinkinase-Aktivität der Rezeptor-Ketten. Trotzdem werden der Rezeptor und diverse zytoplasmatische Proteine nach Bindung von IL-4 an den Rezeptor-Komplex phosphoryliert. Vermittelt wird dies über Tyrosinkinasen, die mit den Rezeptorketten assoziiert sind. Im Falle eines aus IL-4R α und γ_c bestehenden IL-4R-Komplexes sind das die Januskinasen JAK1

und JAK3 [45, 46], die konstitutiv an die Homologie Box 1 in der membranproximalen Region der beiden Rezeptorketten gebunden sind [47]. Die Bindung von IL-4 führt zur Heterodimerisierung der Rezeptorketten und triggert so die Autophosphorylierung und Aktivierung der Januskinasen (Abb. 1). Diese wiederum können jetzt Tyrosinreste der intrazellulären Domäne der IL-4R α -Kette phosphorylieren, wodurch Bindungsstellen für verschiedene zytoplasmatische Signalproteine entstehen, die dann ihrerseits durch die JAK's phosphoryliert werden.

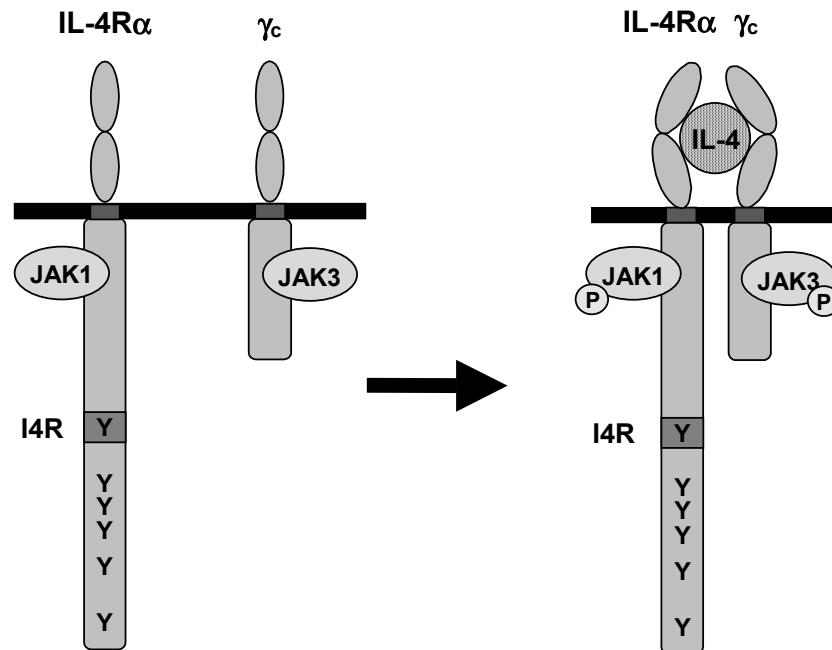


Abb. 1 Signaltransduktion über den IL-4R (1): Durch Heterodimerisierung der Rezeptoruntereinheiten nach Bindung von IL-4 kommt es zur Autophosphorylierung und Aktivierung der Januskinasen.

Zwei Wege der dadurch in Gang gesetzten Signaltransduktionskaskade sind in den Abbildungen 2 und 3 schematisch dargestellt. Wird der einzelne Tyrosinrest Y497 im schon erwähnten I4R-Motiv phosphoryliert, können hier IRS1 (Insulin-Rezeptor-Substrat-1) bzw. sein Homolog 4PS/IRS2 ankoppeln und ihrerseits durch die Januskinasen phosphoryliert werden [48, 49, 50, 51]. Phosphoryliertes 4PS/IRS2 kann verschiedene SH2-Domänen enthaltende Signalmoleküle binden, was zu einer Aktivierung von Genen führt, die für die Proliferation der Zelle verantwortlich sind (Abb. 2) [49]. Der Transkriptionsfaktor STAT6 (Signal Transducer and Activator of Transcription) bindet in der Region der schon beschriebenen C-terminal gelegenen Tyrosinreste Y575, Y603 und Y631. Zwei STAT6-Moleküle können nach ihrer Phosphorylierung dimerisieren, translozieren in den Zellkern und binden dort an Promotorregionen von Genen, deren Expression durch IL-4 hochreguliert wird (Abb. 3) [52, 53, 54, 55, 56, 57].

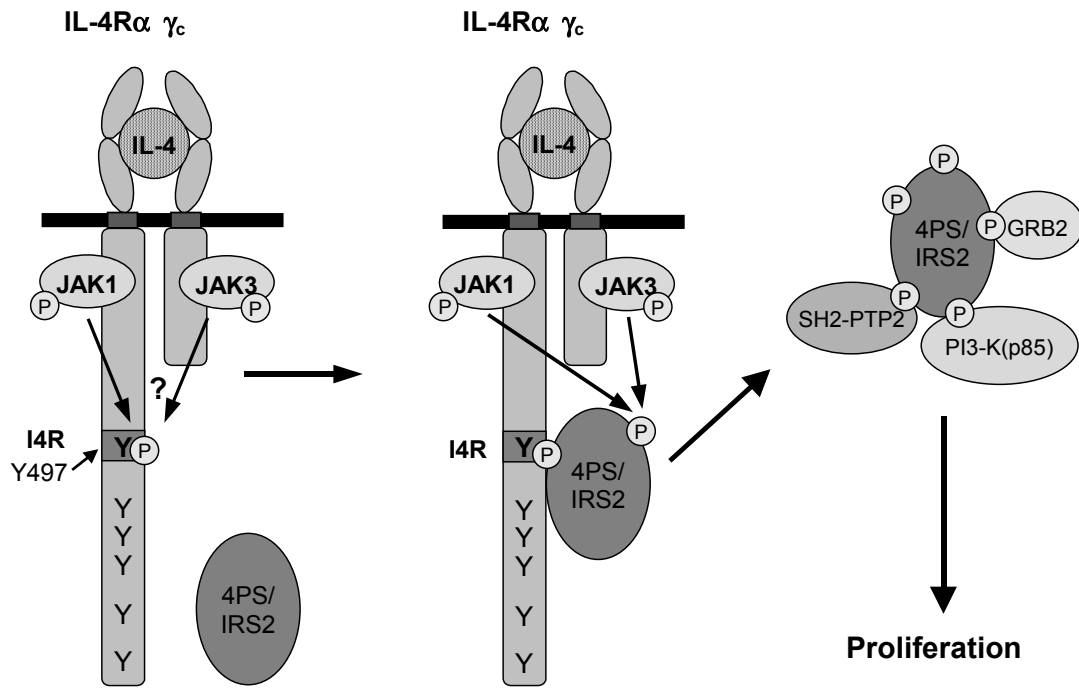


Abb. 2 Signaltransduktion über den IL-4R (2): Wahrscheinlich sind die Januskinasen auch für die Phosphorylierung des I4R-Motivs verantwortlich. Hier kann dann 4PS/IRS2 koppeln, das dann nach Phosphorylierung durch die Januskinasen diverse andere Signalmoleküle bindet. Dieser Weg führt über weitere, noch weitgehend ungeklärte Mechanismen zur Proliferation der Zelle.

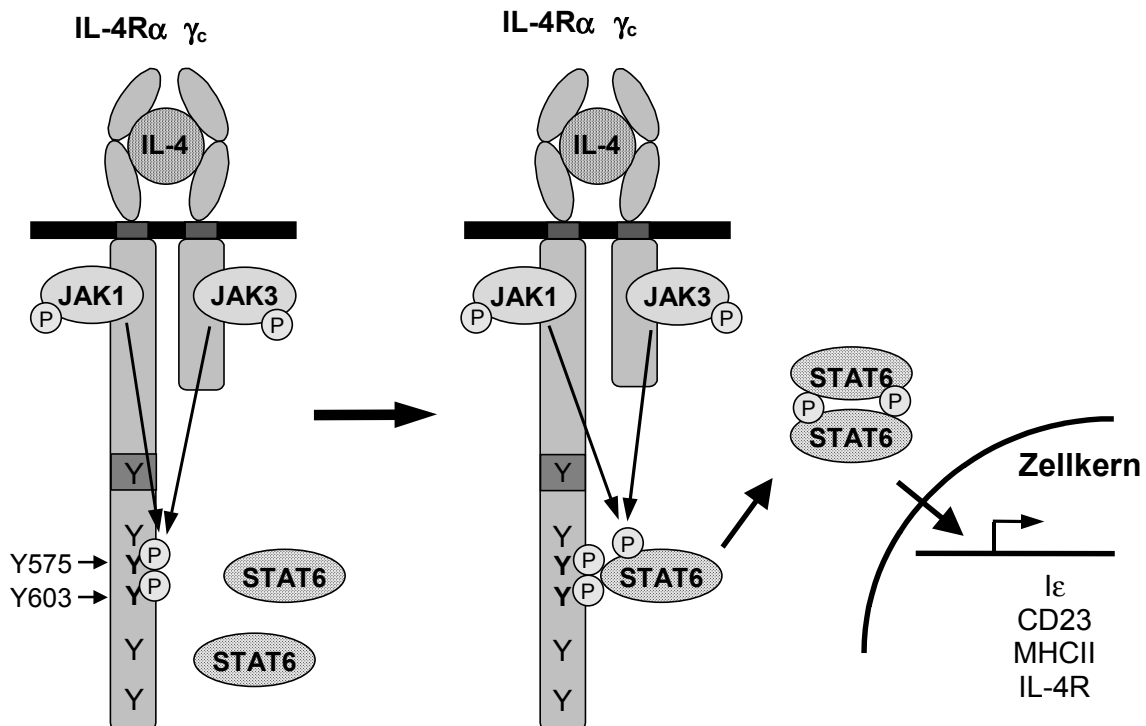


Abb. 3 Signaltransduktion über den IL-4R (3): Die aktivierten Januskinasen phosphorylieren zwei Tyrosinreste im C-terminalen Bereich des Rezeptors. Dadurch entsteht eine Bindungsstelle für STAT6. STAT6 wird seinerseits durch die Januskinasen phosphoryliert und transloziert als Homodimer in den Zellkern, wo es an die Promotoren der dargestellten Gene bindet.

1.2.3 Funktionelle Domänen des IL-4R

Die beiden hier dargestellten Wege der Signaltransduktion, die entweder über die Aktivierung von 4PS/IRS2 zur Proliferation der Zelle oder über die Aktivierung von STAT6 zur Expression von bestimmten Faktoren und damit zur Differenzierung der Zelle führen, geben sicherlich nur einen kleinen Teil der ablaufenden Mechanismen wieder. Die zum Teil sehr widersprüchlichen Ergebnisse der Untersuchungen mit IL-4R α -Deletionsmutanten machen deutlich, daß die eigentlichen Vorgänge sehr viel komplexer sind und daß sich weder die Signalmoleküle noch die beiden Effekte Proliferation und Differenzierung streng bestimmten funktionellen Domänen zuordnen lassen.

So zeigen einige Untersuchungen, daß das schon oben erwähnte I4R-Motiv mit seinem Tyrosin-Rest an Position 497 (Y497) essentiell für die proliferativen Eigenschaften des IL-4R α ist. Rezeptormutanten, in denen dieses Motiv deletiert ist oder Y497 gegen Phenylalanin ausgetauscht ist, können in diesen Studien kein Proliferationssignal mehr vermitteln [48, 58, 59, 60]. In anderen Untersuchungen jedoch konnte über Rezeptormutanten, deren zytoplasmatische Domäne ebenfalls proximal des I4R-Motives trunkiert ist, Proliferation vermittelt werden [61, 62, 63]. Ebenso widersprüchliche Ergebnisse gibt es bei der Zuordnung der differenzierenden Signale zu bestimmten funktionellen Domänen. Ryan *et al.* zeigten, daß mindestens einer der drei Tyrosinreste Y575, Y603 und Y631 für die Aktivierung von STAT6 bzw. für die Expression von CD23, MHCII oder I ϵ notwendig ist [57], und andere Autoren zeigten die Fähigkeit der Peptidsequenzen, die die Tyrosinreste Y603 und Y631 flankieren, an STAT6 zu binden [52, 64]. Dennoch konnten in anderen Studien Rezeptormutanten ohne diese Region und sogar ohne einen einzigen Tyrosinrest, der als Bindungsstelle für die SH2-Domäne von STAT6 dienen könnte, die Aktivierung von STAT6 induzieren [63, 65].

Für diese widersprüchlichen Ergebnisse sind bisher noch keine zufriedenstellenden Erklärungen gefunden worden. Es läßt sich nicht ausschließen, daß diese Ungereimtheiten teilweise auf methodischen Problemen beruhen. Beispielsweise machen die Nutzung unterschiedlicher Zellsysteme und die damit verbundene unterschiedliche Expression von Signalmolekülen die Ergebnisse in den verschiedenen Arbeiten nur eingeschränkt vergleichbar. Entscheidend ist sicherlich auch, daß die Vielschichtigkeit der an der Signaltransduktion beteiligten Elemente bisher noch nicht zu überblicken ist. Das bedeutet, daß durch den Einfluß von bisher noch nicht identifizierten Domänen und/oder Signalmolekülen, insbesondere auch von negativ regulierenden Zell-Phosphatasen die Interpretation der Ergebnisse erschwert wird. Hinzu kommen nicht vorhersehbare Veränderungen der dreidimensionalen Molekülstruktur der Deletions-/Mutationskonstrukte, wodurch Bindungsstellen für Signalmoleküle eventuell unbrauchbar werden.

Dennoch gibt es einige Domänen in der zytoplasmatischen Region des IL-4R, die übereinstimmend in mehreren Untersuchungen als essentiell für bestimmte Bereiche der Signaltransduktion identifiziert wurden. In der Region der membranproximal gelegenen Homologie-Box 1, einer innerhalb der Zytokin-Rezeptoren konservierten Prolin-reichen Sequenz, bindet die Januskinase JAK1. Die Deletion dieser Domäne oder die Mutation ihrer Prolinreste führt in den veröffentlichten Studien regelmäßig zum Verlust der Fähigkeit, proliferative oder differenzierende Signale zu vermitteln [58, 63, 65]. Eine andere Domäne in der Region zwischen AS 355 und 390 ist ebenfalls ausnahmslos in den veröffentlichten Arbeiten sowohl für die Proliferation wie für die Differenzierung der Zelle als Antwort auf IL-4 essentiell [58, 62, 63]. Zwei in dieser Region auffällige Strukturen sind eine Glutaminsäure-reiche und eine Serin-reiche Sequenz. Der Austausch sämtlicher Glutamat- oder Serin-Reste führte jedoch nicht zum Verlust der Funktion dieser Domäne [62].

1.3 RNA Splicing

1.3.1 Konstitutives Splicing

Vergleicht man die Nukleotidsequenz einer reifen mRNA mit der ihres zugrundeliegenden Genes, findet man die für die mRNA kodierende Region der DNA durch lange Segmente unterbrochen, die in der reifen mRNA fehlen. Diese nicht kodierenden Regionen der DNA werden als Intron-Sequenzen bezeichnet, während die Bereiche, aus denen sich die reife mRNA zusammensetzt und die auch die für das Protein kodierenden Sequenzen enthalten, Exons genannt werden. Das primäre RNA-Transkript ist eine exakte Kopie des Genes und enthält daher sowohl die Intron- als auch die Exon-Sequenzen. Bei der folgenden Umwandlung dieser unreifen Vorläufer-mRNA (precursor mRNA, pre-mRNA) in ein reifes mRNA-Molekül, das direkt für ein Protein kodieren kann, werden über einen komplexen enzymatischen Vorgang die Introns herausgeschnitten und die Exon-Sequenzen miteinander verbunden. Diese Reaktion wird als RNA Splicing bezeichnet.

1.3.1.1 Intron-Konsensus-Sequenzen, Splicing Elemente im Intron [66]

Damit beim Splice-Vorgang das Herausschneiden der Introns und das Zusammenfügen der Exons präzise ablaufen kann, ist eine korrekte Erkennung der Exon-Intron-Grenzen, der sog. *splice sites*, erforderlich. Eine wichtige Rolle als Erkennungssequenzen spielen dabei die konservierten Intron-flankierenden Nukleotide an der 5'-*splice site* (*acceptor site*) bzw. der 3'-*splice site* (*donor site*). Die Stärke/Zuverlässigkeit einer *splice site* ist dabei durch ihre Übereinstimmung mit diesen Konsensus-Sequenzen definiert (Abb. 4). Weitere für den Splice-Vorgang wichtige Intron-Motive sind ein an die 3'-*splice site* angrenzender Polypyrimidin-Trakt und etwas weiter upstream ein einzelnes A-Nukleotid innerhalb der sog.

branch site (Abb. 4). Das *branch site*-A-Nukleotid ist in Hefen Teil einer hoch konservierten Sequenz, deren Mutation den Splice-Vorgang verhindert. In höheren Eukarionten ist dieser Bereich weit weniger konserviert und zeigt nur Bevorzugungen für Purine oder Pyrimidine an bestimmten Positionen. Bei Mutationen oder Deletionen der *branch site* können in vielen Fällen andere benachbarte Sequenzen deren Funktion ersetzen, so daß es zu keiner Veränderung des Splice-Produktes kommen muß.

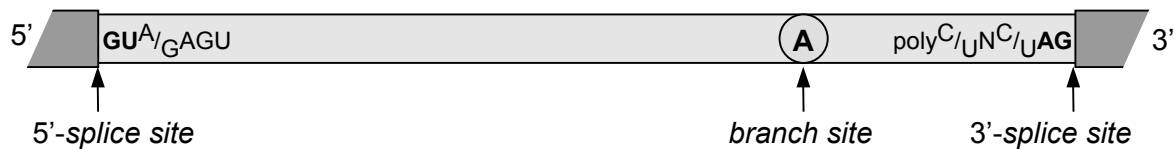


Abb. 4 Konsensus-Sequenzen der 5'- und 3'-splice site des Introns.

1.3.1.2 Mechanismus des RNA Splicing [66]

Die eigentliche chemische Reaktion des Splicing, das Herausschneiden der Intron-Sequenzen und Zusammenfügen der Exons, beinhaltet zwei transesterifizierende Reaktionen. Bei der ersten wird die 5'-splice site durch nukleophilen Angriff der 2'-OH-Gruppe des *branch site*-A-Nukleotid gespalten. Das nun freie 5'-Ende des Introns verbindet sich kovalent über eine 5'-2'-Phosphodiester-Bindung mit dem *branch site*-A-Nukleotid, wobei sich ein Ring (engl. *ariat*: Lasso) formt. In der zweiten Reaktion spaltet das entstandene freie 3'-Ende des 5'-Exons die RNA an der 3'-splice site, und die Phosphodiesterbindung der 3'-splice site wird auf das freie 3'-Ende des 5'-Exons übertragen. Das auf diese Weise herausgeschnittene Intron wird wieder linearisiert und rasch degradiert.

Diese chemischen Reaktionen werden durch die Komponenten des Splice-Apparates katalysiert, die als Splicing-Faktoren bezeichnet werden und im Zellkern die sog. Spliceosomen bilden. Spliceosome sind große Komplexe, die sich aus Ribonukleoproteinen zusammensetzen. Sie enthalten ca. 40 unterschiedliche Proteine und kleine nukleäre RNA-Moleküle (*small nuclear RNAs*, snRNAs), die in kleinen Komplexen als Ribonukleoprotein-Partikel (snRNP) existieren und nach der enthaltenen snRNA als U1, U2, U4/6 und U5 snRNP benannt werden. Eine große Anzahl der im Spliceosom enthaltenen Proteine sind nicht Teil der snRNPs. Zu diesen non-snRNP-Splicing-Faktoren gehören unter anderen der U2 snRNP Auxiliary Factor (U2AF) mit seinen beiden Untereinheiten U2AF⁶⁵ und U2AF³⁵ und die Familie der SR-Proteine [67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74].

Bei vielen Faktoren, RNAs und Proteinen, die in den Splice-Vorgang verwickelt sind, sind bereits Domänen beschrieben, mit denen die Faktoren untereinander oder an die pre-mRNA binden können. So besitzt die U1 snRNA an ihrem 5'-Ende eine einzelsträngige Sequenz,

die komplementär zur Konsensus-Sequenz der 5'-*splice site* ist. U2 snRNA enthält Sequenzen, die komplementär zur *branch site* sind [75], U2AF⁶⁵ bindet an den Polypyrimidin-Trakt [76], U6 snRNA bindet an die 5'-Konsensus-Sequenz der pre-mRNA und kann Basenpaarungen mit U2 snRNA ausbilden, und U5 snRNA assoziiert mit Exon-Sequenzen im Bereich der 5'- und der 3'-*splice sites* [77]. Alle diese Bindungen werden durch weitere Splicing-Faktoren, vornehmlich die SR-Proteine, stabilisiert bzw. ermöglicht.

Im frühesten funktionellen Splicing-Komplex (E-(*early*-)Komplex) [78] bindet das U1 snRNP an die 5'-*splice site* und U2AF mit seiner Untereinheit U2AF⁶⁵ an den Polypyrimidin-Trakt der pre-mRNA. Diese Bindungen werden durch SR-Proteine gefördert, die wahrscheinlich direkt mit dem U1-70K Protein [79] und der U2AF³⁵ Untereinheit [80, 81] interagieren. Mit der Formation dieses E-Komplexes hat bereits die Spezifizierung der *splice sites* stattgefunden.

Mit der Bindung des U2 snRNP an die pre-mRNA bildet sich der A-Komplex. U2AF⁶⁵ erleichtert mit seiner RS-Domäne durch Neutralisierung der negativ geladenen Phosphate der pre-mRNA die Basen-Paarung der U2 snRNA an die *branch site* [75]. Außerdem wird durch die Bindung verschiedener U2 snRNP Untereinheiten an eine Region von 20 Nukleotiden *upstream* der *branch site*, die sog. *anchoring site*, der Komplex stabilisiert [82, 83].

Bei der Bildung des B-Komplexes löst sich U1 snRNP von der 5' *splice site*, und stattdessen assoziiert das präformierte U4/U6-U5 tri-snRNP mit der pre-mRNA, wobei U5 snRNA mit Exon-Sequenzen [77] und U6 snRNA mit Intron-Sequenzen an der 5'-*splice site* interagiert. Das nun reife Spliceosom enthält jetzt alle für die katalytischen Reaktionen benötigten Komponenten.

Im C-Komplex wird durch die Dissoziation der U4 snRNA von dem U4/U6 Komplex die erste Transesterifizierungsreaktion getriggert. U6 snRNA nimmt nach Abdissoziation von U4 snRNA eine neue Konformation an, durch die eine Basenpaarung mit U2 snRNA möglich wird. Dadurch werden die 5'-*splice site* und das *branchpoint* A-Nukleotid für den ersten Transesterifizierungsschritt zueinander gebracht [84]. U5 ist möglicherweise an der zweiten Transesterifizierung maßgeblich beteiligt. Durch zusätzliche Bindung an der 3'-*splice site* des *downstream* Exons bringt es das freie 3'-Ende an die 3'-*splice site* heran und spielt somit gemeinsam mit assoziierten Proteinen zumindest eine stabilisierende Rolle bei dem zweiten katalytischen Schritt [77].

1.3.1.3 **SR-Proteine** [74, 85]

SR-Proteine (SRp) sind einerseits essentielle Splicing-Faktoren [73], die schon früh in der Bildung der Spliceosomen wirken. Andererseits stellen sie wichtige Regulatoren des alternativen Splicing dar [86, 87]. Als gemeinsame Strukturen besitzen die Mitglieder der

SR-Protein-Familie eine aminoterminal gelegene RNA-bindende Domäne (RBD) und carboxyterminal die sog. RS-Domäne, die zahlreiche sich wiederholende Arginin-(R-)Serin-(S-)Dipeptide enthält und der eine wichtige Funktion bei Protein-Protein-Interaktionen im Spliceosom zukommt. Eine zweite Gruppe essentieller Splicing-Faktoren und Splicing-Regulatoren, die ebenfalls RS-Domänen enthalten, werden als SR-Protein-verwandte Polypeptide (*SR protein related polypeptides*, *SRrp*) zusammengefaßt. Dazu gehören unter anderem die 70K-Untereinheit von U1 snRNP und die beiden Unterheiten des U2AF. Eine weitere Gruppe von Splicing-Faktoren besitzen zwar keine RS-Domänen, sollen aber wegen ihrer regulatorischen Funktionen an dieser Stelle erwähnt werden. Im Gegensatz zu den positiv regulatorischen SR-Proteinen besitzen diese Faktoren negativ regulatorische Eigenschaften und antagonisieren die Aktivität der SR-Proteine. Zu ihnen gehören unter anderem die sogenannten heterogenen nukleären Ribonukleoproteine hnRNP A, hnRNP B und hnRNP I/PTB.

In *in-vitro*-Splicing Experimenten mit sogenannten S100-Zellextrakten, die alle für den Splice-Vorgang notwendigen Komponenten mit Ausnahme der SR-Proteine enthalten, konnte gezeigt werden, daß SR-Proteine für den Splice-Vorgang essentiell sind und sie sich bis zu einem gewissen Grade gegenseitig ersetzen können. Diese Redundanz zeigt sich besonders in einfachen *in vitro*-Splicing-Systemen, während bei zunehmender Komplexität der Systeme die Spezifität der unterschiedlichen SR-Proteine offensichtlich wird.

1.3.1.4 Interaktionen der SR-Proteine im Spliceosom [74, 85, 88]

SR-Proteine sind bereits für die Bildung des E-Komplexes essentielle Faktoren. Sie ermöglichen und stabilisieren Bindungen der snRNPs untereinander und an die pre-mRNA, wobei die zugrundeliegenden Mechanismen (in Abhängigkeit von der pre-mRNA) wahrscheinlich sehr vielfältig sind. Es besteht die Vorstellung von einem sehr komplexen Netzwerk der SR-Proteine im Spliceosom. Hierbei agieren sie beispielsweise direkt mit Elementen der pre-mRNA und vermitteln so Interaktionen zwischen der pre-mRNA und den snRNP. Sie können aber auch Bindungen zwischen den snRNAs bzw. deren assoziierten Proteinen untereinander herstellen. Dies kann zur Bildung einer Brücke aus einem oder mehreren SR-Proteinen führen, die ein Intron oder auch ein Exon überspannen und so passende *splice sites* zueinander bringen können.

Durch die Bindung der SR-Proteine an sogenannte Exon-Enhancer wird ein solcher Komplex zusätzlich stabilisiert. Exon-Enhancer sind purinreiche Exon-Sequenzen und können das Splicing eines angrenzenden Introns fördern [89]. Sie finden sich bevorzugt assoziiert mit schwachen *splice sites*, die häufig variabel gespleißt werden. Bindet ein SR-Protein [78, 90, 91, 92, 93] an die Enhancer-Sequenz, kann es so durch die schon eben beschriebene Brückenbildung über das Exon hinweg die Bindung von U2AF an den Polypyrimidin-Trakt im

upstream gelegenen Intron und/oder von U1 snRNP im Intron downstream erleichtern bzw. stabilisieren und so das Splicing schwacher *splice sites* fördern [90, 91].

1.3.1.5 Regulation von SR-Proteinen

Phosphorylierung und Dephosphorylierung der SR-Proteine und möglicherweise auch anderer Splicing-Faktoren wie U1-70K [94] spielen eine entscheidende Rolle bei der Regulation von Splicing-Prozessen [95]. Die Behandlung von Splicing-Extrakten mit Phosphatasen zu unterschiedlichen Zeitpunkten des Splice-Vorganges zeigte, daß die Phosphorylierung von SR-Proteinen und eventuell auch weiteren Faktoren für die Bildung des frühen Pre-Spliceosoms, des E-Komplexes essentiell ist, die Dephosphorylierung der Faktoren nach der Formation eines funktionsfähigen Spliceosoms den Ablauf des Splicing jedoch nicht mehr verhindert [95]. Andererseits blockiert die Behandlung mit einem Phosphatase-Inhibitor die beiden katalytischen Reaktionen des Splicing, verhindert aber nicht die Bildung eines vollständigen, wenn auch inaktiven Spliceosoms [96]. Passend zu diesen Beobachtungen konnten bisher drei Kinasen identifiziert werden, die RS-Domänen phosphorylieren, nämlich die SR-Protein spezifischen Kinasen SRPK 1 [97, 98] und 2 [99] und außerdem Clk/Sty [100, 101], die auch über eine RS-Domäne verfügt, über die sie mit anderen RS-Domänen besitzenden Proteinen agiert.

1.3.2 Alternatives Splicing

Durch Selektion unterschiedlich miteinander kombinierter *splice sites* kommt es zur Entstehung verschiedener reifer mRNAs aus einer gemeinsamen pre-mRNA. Hierbei können ganze Exons oder Introns ein- oder ausgeschlossen bzw. alternativ genutzt werden, oder die Variationen können nur Teile von Exons oder Introns betreffen. Beispiele für die Entstehung unterschiedlicher mRNAs durch alternatives Splicing sind in Abb. 5 dargestellt.

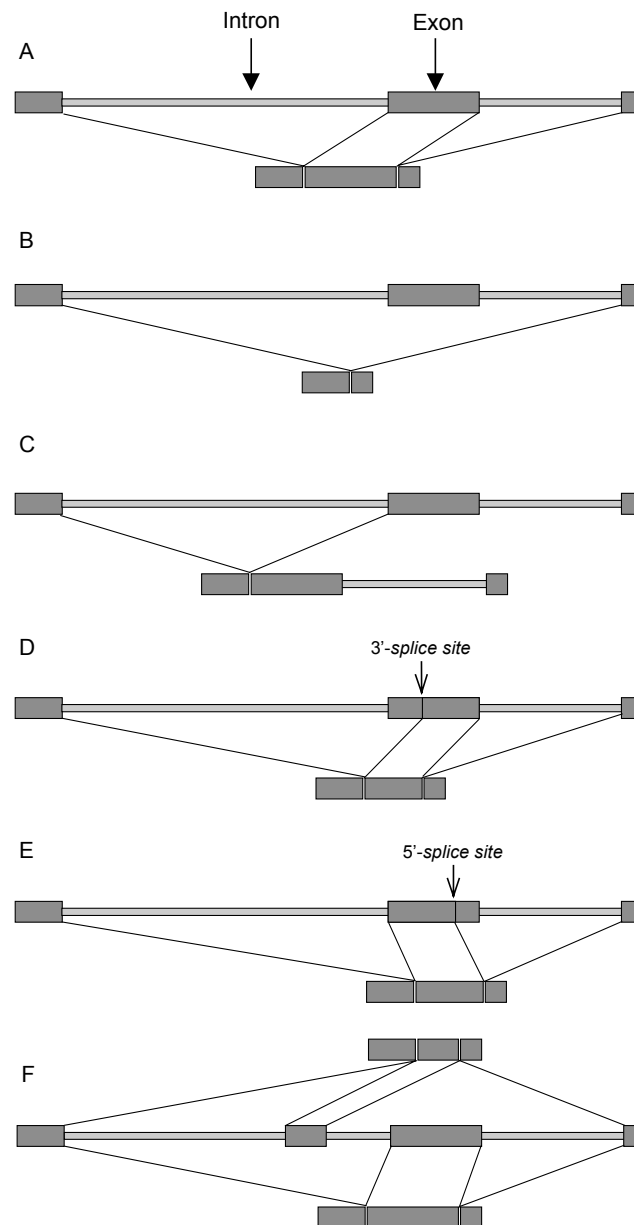


Abb. 5 Schematische Darstellung der Entstehung unterschiedlicher reifer mRNAs aus einer gemeinsamen precursor-mRNA. In A ist der „normale“ Spleißing-Vorgang dargestellt, in B ist ein vollständiges Exon ausgelassen worden („*exon skipping*“), in C verbleibt in der mRNA ein vollständiges Intron, in D und E werden alternative *splice sites* innerhalb des Exons genutzt, so daß Teile des Exons ausgelassen werden, und in F kommt es zur alternativen Nutzung zweier unterschiedlicher Exons.

1.3.2.1 Regulation von alternativem Splicing, Rolle der SR-Proteine

Zusätzlich zu ihrer Funktion als konstitutive Splicing-Faktoren können SR-Proteine die Wahl von 5'- und 3'-*splice sites* beeinflussen. Die absoluten und relativen Mengen der SR-Proteine in einer Zelle und deren Aktivierungszustand durch Phosphorylierung beeinflussen im kompliziertem Zusammenspiel mit *cis acting*-Elementen der pre-mRNA, wie z.B. Exon-Enhancern, und negativen Regulatoren das Schicksal eines primären Transkriptes.

Um die Komplexität dieser Vorgänge deutlich zu machen, sollen im folgenden einige Beispiele für die Wirkung von Regulator-Proteinen auf den Splice-Vorgang dargestellt werden.

Für das SR-Protein ASF/SF2 konnte gezeigt werden, daß es wahrscheinlich unselektiv über eine Interaktion mit U1-70K die Besetzung möglicher 5'-*splice sites* durch U1 snRNP fördert [79, 102]. Sind zwei miteinander konkurrierende 5'-*splice sites* gleichermaßen mit U1 snRNP besetzt, wird diejenige 5'-*splice site* gewählt, die sich proximal zur 3'-*splice site* befindet [102]. Ein Anstieg der Konzentration von ASF/SF2 führt also zu einer Bevorzugung der proximalen 5'-*splice site*. Der zugrundeliegende Mechanismus ist bisher noch nicht vollständig verstanden.

Die Untersuchung des Einflusses der SR-Proteine SRp30b/SC35, SRp40, SRp55 und SRp75 auf die Wahl alternativer 5'-*splice sites* zweier unterschiedlicher pre-mRNA-Konstrukte mit je einem einzelnen Intron demonstrierte sowohl unterschiedliche Effekte verschiedener SR-Proteine auf dieselbe pre-mRNA als auch umgekehrt unterschiedliche Wirkungen desselben SR-Proteins auf die beiden prinzipiell gleich aufgebauten pre-mRNA-Konstrukte [103]. So fördert beispielsweise SRp30b in einem pre-mRNA-Konstrukt des Simian Virus 40 (SV40) das Splicing mit der proximalen 5'-*splice site*, während unter SRp40, SRp55 und SRp75 bevorzugt die distale 5'-*splice site* genutzt wird. Bei einem Transkript des E1a-Genes kam es dagegen bei diesen drei SR-Proteinen konzentrationsabhängig zu einer Bevorzugung der proximalen 5'-*splice site*. Weiterführende Experimente zeigten, daß SRp40 übereinstimmend mit diesen Beobachtungen die Interaktion von U1 snRNP mit der distalen 5'-*splice site* der SV40 pre-mRNA fördert, während SRp30b die Bindung von U1 snRNP an beide 5'-*splice sites* gleichermaßen begünstigt, was, wie oben bereits erwähnt, zur Nutzung der proximalen 5'-*splice site* führt [104]. Diese Beobachtung läßt sich aber, zumindest in diesem Fall, nicht mit einer Präferenz der SR-Proteine für bestimmte Sequenzen in der Region der alternativen 5'-*splice sites* erklären, da der Austausch der die beiden 5'-*splice sites* umgebenden Sequenzen die Splicing-Muster nicht veränderte. Dies legt nahe, daß sich die entscheidenden Bindungselemente außerhalb dieser Regionen befinden.

Der antagonistisch wirkende Splicing-Faktor hnRNP/PTB konkurriert mit U2AF um die Bindung am Polypyrimidin-Trakt und behindert so das Splicing der betroffenen 3'-*splice site* [105].

Über die Expression verschiedener Splice-Varianten hat die Zelle die Möglichkeit, post-transkriptionell die Expression bestimmter Proteine zu regulieren. Welche Stimuli bei der differentiellen Expression der Splice-Varianten eine Rolle spielen, ist weitgehend noch nicht geklärt. Die entscheidende Funktion der Splicing-Faktoren legt nahe, daß die Expression und Aktivierung dieser Faktoren in diesem Zusammenhang bedeutsam sind. Es gibt einige

Untersuchungen, die einen möglichen Einfluß unterschiedlicher Funktionszustände einer Zelle auf die Aktivierung von SR-Proteinen zeigen. So ließ sich nachweisen, daß die Phosphorylierung der SR-Proteine entsprechend der Aktivität der spezifischen Kinase SRPK 1 zellzyklusabhängig reguliert wird [97]. Während apoptotischer Prozesse konnte eine Assoziation phosphorylierter SR-Proteine mit dem U1 snRNP-Komplex nachgewiesen werden [106]. Eine direkte Auswirkung solcher Aktivierungsänderungen von SR-Proteinen auf daraus resultierende veränderte Splicing-Muster bestimmter alternativ gespleißter Produkte ist zwar naheliegend, Untersuchungen dazu ließen sich jedoch in der bisher veröffentlichten Literatur nicht finden. Die Untersuchung der Expression von SR-Proteinen in verschiedenen Gewebetypen zeigte reproduzierbar spezifische Expressionsmuster mit unterschiedlichen absoluten und relativen Mengen der SR-Proteine [103]. Ein Zusammenhang mit gewebeabhängigen Splicing-Mustern bestimmter mRNAs erscheint auch hier wahrscheinlich [107].

1.3.2.2 Alternatives Splicing bei Zytokin-Rezeptoren

Auch in der Familie der Zytokin-Rezeptoren ist alternatives Splicing ein häufig beobachtetes Phänomen, das es der Zelle ermöglicht, unterschiedliche Proteine aus einem Gen zu generieren. Einige der bekannten Mechanismen, die so zur Entstehung unterschiedlicher Proteinstrukturen führen, sollen folgend kurz aufgeführt werden.

In Abhängigkeit von der Anzahl der Nukleotide, die die durch alternatives Splicing entstandene mRNA-Variante von der „Original“-mRNA unterscheiden, bleibt das Leseraster der mRNA entweder erhalten („*in frame*“), so daß in dem resultierenden Protein lediglich Aminosäuren fehlen oder hinzukommen, oder es kommt zur Verschiebung des Leserasters („*out of frame*“), was zu einer kompletten Änderung der Aminosäuresequenz distal der alternativ gespleißten Region führt. In vielen Fällen hat die Verschiebung des Leserasters die Neuentstehung eines *in frame*-Stop-Codons zu Folge. Die Translation bricht dann an dieser Stelle ab, so daß in Abhängigkeit von der Lokalisation des Stop-Codons mehr oder weniger stark verkürzte Rezeptorketten entstehen.

Kodiert zum Beispiel das in einer alternativ gespleißten mRNA fehlende Exon für die Transmembranregion, entsteht ein lösliches Rezeptorprotein (Abb. 6B). Beispiele hierfür sind die löslichen Varianten der GM-CSF Rezeptor α -Kette [108], des IL-7R [109] und des IL-6R [110]. Ist das Stop-Codon hinter der Transmembranregion gelegen, bleibt der Rezeptor membrangebunden, erhält aber eine verkürzte zytoplasmatische Domäne (Abb. 6C). Dies ist der Fall bei einer Variante des *growth hormone receptor* (GHR) [111] und bei der gemeinsamen β -Kette (*common β chain*, β_c) [112], die von den Rezeptoren für IL-3, IL-5 und GM-CSF genutzt wird.

Zusätzliche Exons (die Frage, welche der Varianten in diesem Fall durch ein "normales" Splicing-Ereignis entsteht, soll hier offenbleiben) enthalten häufig ein Stop-Codon. Befindet sich dieses vor der Transmembranregion, resultiert wieder ein lösliches Protein (Abb. 6D), wie zum Beispiel für den IL-5R [113] und den IL-4R der Maus [114] beschrieben. Beim Erythropoietin-Rezeptor (EpoR) ist eine membrangebundene Variante mit stark verkürzter zytoplasmatischer Domäne bekannt [115]. Hier liegt das zusätzliche Exon downstream des für die Transmembranregion kodierenden Bereiches (Abb. 6E).

Ein weiteres interessantes Beispiel stellt *c-kit*, der Rezeptor des *stem cell factor* (SCF) dar [116, 117]. Hier kodiert in einer Splice-Variante eine kurze, vor der Transmembranregion gelegene Insertion für eine Protease-sensitive Region. Das daraus entstehende Protein wird an dieser Stelle bevorzugt proteolytisch gespalten, so daß ein löslicher Rezeptor entsteht (Abb. 6F).

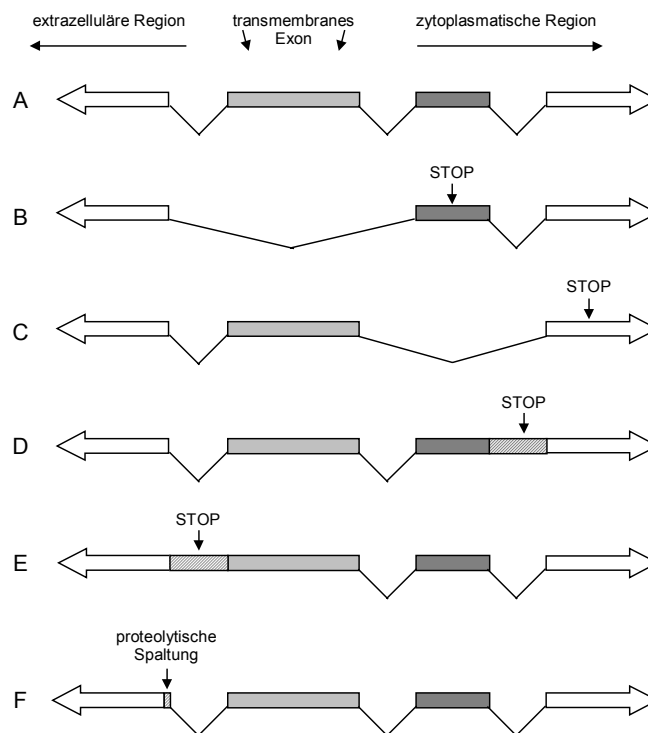


Abb. 6 Beispiele für Strukturen unterschiedlicher mRNA Splice-Varianten. Bei den Varianten B und C kommt es durch eine Verschiebung des Leserasters zur Entstehung eines vorzeitigen in frame-Stop-Codons, bei den Varianten D und E enthält ein zusätzliches Exon ein Stop-Codon. Die Variante F enthält zusätzliche Nukleotide, die für eine Protease-sensitive Region kodieren. Die mRNA in A kodiert für den Rezeptor voller Länge, aus den Varianten B, E und F resultieren lösliche Rezeptoren und aus den Varianten C und D membranständige Rezeptoren mit mehr oder weniger verkürzten intrazellulären Domänen.

Aus den geänderten Strukturen der resultierenden Proteine der Splice-Varianten ergeben sich häufig auch geänderte Eigenschaften. Für die löslichen Rezeptoren stehen unterschiedliche biologische Effekte zur Diskussion. Sie können die Wirkung ihrer Zytokine

antagonisieren, aber diesen auch als Träger- und Transportproteine dienen [118]. Für einige Rezeptor-Varianten mit verkürzter zytoplasmatischer Domäne konnte durch Transfektion von Zellen und funktionelle Tests gezeigt werden, daß sich diese in ihren biologischen Eigenschaften von den Rezeptoren voller Länge unterscheiden. Zu erwähnen ist hierbei nochmals die Variante des EpoR. Hier fehlen der verkürzten Rezeptorkette wesentliche zytoplasmatische Domänen, so daß kein Proliferationssignal vermittelt werden kann [115, 119]. Ein anderes Beispiel ist die schon oben erwähnte verkürzte Splice-Variante der β_c -Kette (β_{IT}). Wird diese zusammen mit der GM-CSF Rezeptor α -Kette (GMR α) in geeigneten Zellen koexprimiert, zeigt sich auch hier, daß ein solcher Rezeptor-Komplex keine GM-CSF induzierte Proliferation vermitteln kann [112]. Im Gegensatz dazu zeigte sich in Transfektionsstudien mit zwei alternativ gespleißten Isoformen der GM-CSF-Rezeptor α -Kette, die sich in ihrem C-terminalen Ende der zytoplasmatischen Domäne durch Benutzung zweier alternativer Exons voneinander unterscheiden, funktionell hinsichtlich Induktion von Proliferation oder Differenzierung kein signifikanter Unterschied zwischen den Varianten [120].

Es gibt Hinweise dafür, daß in verschiedenen Differenzierungsstadien hämatopoietischer Zellen unterschiedliche Splice-Varianten von Zytokin-Rezeptoren exprimiert werden. So wurde gezeigt, daß es bei der Differenzierung der myeloischen Zelllinie HL60 durch Dimethylsulfoxid zu Neutrophilen zu einer Herunterregulation einer weiteren Splice-Variante von GMR α , die für einen löslichen Rezeptor kodiert, und einer Hochregulation des membrangebundenen Rezeptors kommt [121]. Ein weiteres Beispiel stellt die oben bereits erwähnte verkürzte Splice-Variante des EpoR dar. Diese dominiert im frühen Stadium der erythroiden Entwicklung, während die Expression des EpoR voller Länge mit weiterer Differenzierung der Zellen zunimmt [115, 119]. Gale *et al.* beobachteten, daß in Stimulationsversuchen mit GM-CSF die Expression der Splice-Variante β_{IT} in myeloischen Blasten parallel zur Differenzierung der Zellen deutlich zurückging [112]. Dies ließ die Autoren folgern, daß hier ebenfalls einen Zusammenhang zwischen der Expression von β_{IT} und der Differenzierung myeloischer Zellen besteht.

2 FRAGESTELLUNG

IL-4 bzw. dessen Rezeptor sind an der Proliferation, Differenzierung und Aktivierung verschiedener immunologischer Effektorzellen beteiligt, so daß ihnen somit potentiell eine Rolle bei der Entstehung und Abwehr von Leukämien zukommt. Aber auch der direkte Einfluß von IL-4 auf die Rezeptor-tragende Leukämiezelle könnte in der Leukämogenese möglicherweise eine Rolle spielen. Bei einigen Interleukin-Rezeptoren sind alternativ gespleißte mRNAs identifiziert worden, die für funktionell geänderte Proteinisoformen kodieren und deren Expression die Wirkung des jeweiligen Interleukins auf die Zelle beeinflusst. Über die Expression solcher alternativ gespleißten Transkripte ist eine Regulation der Proteinexpression auf posttranskriptioneller Ebene möglich. Zusammenhänge mit der Differenzierung, unterschiedlichen Aktivierungszuständen der Zelle oder der Zellart werden vermutet, in vielen Fällen ist jedoch noch nicht geklärt, welche Bedeutung diesen Splice-Varianten *in vivo* zukommt.

In der vorliegenden Arbeit wurde eine bisher unbekannte alternativ gespleißte mRNA der IL-4R α -Kette identifiziert, die für ein Rezeptorprotein mit geänderter Struktur der zytoplasmatischen Domäne kodiert.

Zur weiteren Untersuchung dieser Splice-Variante wurde für die vorliegende Promotionsarbeit zunächst folgende Fragestellung formuliert:

- Welche Funktion der IL-4R α Splice-Variante wäre ausgehend von ihrer Proteinstruktur zu erwarten?
- Wird sie nach Transfektion eines geeigneten Zellsystems auf der Zelloberfläche exprimiert?
- Hat sie die Fähigkeit, Signaltransduktion zu vermitteln und somit Proliferation zu induzieren und die Auslösung von Apoptose zu verhindern?
- Gibt es bei pädiatrischen Patienten mit akuter lymphoblastischer Leukämie (ALL) interindividuelle Unterschiede in der Expression der Splice-Variante von IL-4R α -mRNA in Relation zum IL-4R α voller Länge?
- Gibt es einen Unterschied in der Expression der IL-4R α -mRNA Splice-Variante zwischen Patienten mit ALL und gesunden Probanden?
- Korreliert die Expression der Splice-Variante der IL-4R α -mRNA mit bestimmten Immunphänotypen der ALL-Blasten oder mit der Prognose der Erkrankung?

Die Auswertung dieser Untersuchungen ergab einen deutlichen Zusammenhang der Expression der alternativ gespleißten IL-4R α -mRNA mit dem Zeitraum zwischen Abnahme und Aufarbeitung des Untersuchungsmaterials. Ausgehend davon stellten sich im Verlauf der Arbeit folgende weitere Fragen:

- Ist das an den Patientenproben beobachtete Phänomen der experimentell nachvollziehbar?
- Ist die Veränderung der Expression von Splice-Varianten bei verzögerter Aufarbeitung des Untersuchungsmaterials auch bei anderen Interleukinen/Interleukin-Rezeptoren zu beobachten?
- Beruht die veränderte Expression der IL-4R α -Splice-Variante bei verzögerter Aufarbeitung des Untersuchungsmaterials auf unterschiedlichen mRNA-Stabilitäten der beiden Splice-Varianten oder handelt es sich um eine Änderung der Expression der mRNAs?

3 MATERIAL UND METHODEN

3.1 Patientenproben und Zelllinien

3.1.1 Patienten

Knochenmark-(KM-)Aspirate (n=155) oder peripheres Blut (n=42) von 131 pädiatrischen Patienten mit Erkrankung an einer akuten lymphoblastischen Leukämie (ALL) (7 prä-prä-B, 70 common, 24 prä-B, 2 B, 2 prä-T, 15 T, 11 My⁺) wurden auf die Expression der mRNA von IL-4R und IL-4R α_{IT} untersucht. 49 Patienten hatten eine ALL-Ersterkrankung, 82 ein erstes oder folgendes ALL-Rezidiv. Von 32 der Patienten wurden KM und PB zum Zeitpunkt der Diagnose, von 10 Patienten ausschließlich Blut zum Zeitpunkt der Diagnose, von 30 Patienten KM-Proben zum Zeitpunkt der Diagnose und in Remission nach chemotherapeutischer Behandlung und von 12 Patienten KM ausschließlich in Remission analysiert. Die Patienten mit ALL-Rezidiv wurden an unterschiedlichen Kliniken in Deutschland, Österreich und der Schweiz im Rahmen der ALL-REZ BFM 87-96 Studien therapiert. Das Untersuchungsmaterial für die molekularbiologischen Untersuchungen dieser Patienten wird regelmäßig an die Studienzentrale in Berlin geschickt. Die Patienten mit ALL-Ersterkrankung wurden im Rahmen der ALL-BFM 90-95 Studien an unserer Klinik behandelt.

3.1.2 Zelllinien

Die Expression der IL-4R α - und IL-4R α_{IT} -mRNA wurde in den in der folgenden Tabelle dargestellten humanen Zelllinien untersucht, die Funktionsstudien von IL-4R α_{IT} wurden mit der Maus-Zelllinie Ba/F3 durchgeführt.

Name		Spezies	Firma
Jurkat	akute T-Zell Leukämie	Mensch	Paesel & Lorei GmbH, Hanau
MOLT4	akute T-Zell Leukämie	Mensch	
Raji	Burkitt-Lymphom	Mensch	
KM-H2	Hodgkin-Lymphom	Mensch	DSMZ (Deutsche Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen), Braunschweig
697	prä B-Zell Leukämie	Mensch	
REH	prä B-Zell Leukämie	Mensch	
Ba/F3	pro B-Zell Leukämie	Maus	

3.2 **Material**

3.2.1 **Chemikalien**

Actinomycin D, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen, D.

Acrylamid-/Bisacrylamid-Stammlösungen:

Rotiphorese® NF-Acrylamid/Bis 30% (29:1)	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe, D.
Rotiphorese® NF-Acrylamid/Bis 40% (19:1)	

Agarose:

NuSieve GTG Agarose	Biozym Diagnostics GmbH, Hessisch Oldendorf, D.
SeaKem GTG Agarose	
SeaKem LE Agarose	

Ammonium Persulfate, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen, D.

Borsäure, Merck, Darmstadt, D.

Bromphenolblau, Merck, Darmstadt, D.

Chloroform, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen, D.

Concanavalin A, Boehringer Mannheim GmbH, Mannheim, D.

Dithiothreitol (DTT), Ultra pure, GIBCO BRL, Life Technologies, GmbH, Eggenstein, D.

Essigsäure 100%, Merck, Darmstadt, D.

Ethanol 100% unvergällt, Merck, Darmstadt, D.

Ethidiumbromid, reinst, Serva, Feinbiochemika GmbH, Heidelberg, D.

Ethylenediaminetetraacetic-Acid (EDTA), Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen, D.

Ficoll separating solution, Density 1.077, Seromed® Biochrom KG, Berlin, D.

Formamid, Merck, Darmstadt, D.

Gel-Mix® Running Mate, TBE Buffer, GIBCO BRL, Life Technologies, GmbH, Eggenstein, D.

Harnstoff kristallin, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen, D.

MDE, Gel Solution, FMC BioProducts, Rockland, ME, USA.

Natriumhydroxid, Merck, Darmstadt, D.

Natriumthiosulfat, Merck, Darmstadt, D.

Phenol, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen, D.

Propidiumjodid, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen, D.

Sephadex® G-50 Fine, DNA Grade, Pharmacia Biotech, Freiburg, D.

Silbernitrat 0,1%, Merck, Darmstadt, D.

TEMED, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen, D.

Trizma-Base, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen, D.

Xylencyanol, Merck, Darmstadt, D.

3.2.2 Puffer und Lösungen

1x TBE, pH 8,0:

90 mM	Tris-Borat
2,5 mM	EDTA

1x TAE, pH 8,0:

40 mM	Tris-Azetat
1 mM	EDTA

1x Gelladepuffer (Agarose-Gelelektrophorese):

20%	Ficoll
10 mM	Tris-Puffer (pH 7,5)
1 mg/ml	Orange G

SSCP-Ladepuffer:

95%	Formamid
10 mM	NaOH
0,1%	Bromphenolblau
0,1%	Xylencyanol

Lösungen für die Silberfärbung:

Fixierlösung:

50 ml	Ethanol
2,5 ml	Essigsäure
Aqua dest. ad 500 ml	

Entwicklerlösung:

1,5%	NaOH
0,01%	Natriumthiosulfat

Stopplösung:

10%	Essigsäure
-----	------------

3.2.3 Gele

Sequenzierung

8,4 ml Acrylamid/Bisacrylamid (29:1, 30%)	
6 ml 10x TBE	
21 g Harnstoff	
<hr/>	
H ₂ O ad 60 ml	
350 µl Ammoniumpersulfat (APS) 10%	
15 µl TEMED	

RNase-Protection-Assay

7,5 ml Acrylamid/Bisacrylamid (19:1, 40%)	
5 ml 10x TBE	
24 g Harnstoff	
<hr/>	
H ₂ O ad 50 ml	

300 µl APS 10%
40 µl TEMED

SSCP-Analyse

12,25 ml 2x MDE
3,5 ml 5x TBE
H₂O ad 35 ml
300 µl APS) 10%
40 µl TEMED

Denaturierendes Top-Gel:

2,5 ml Formamid
2,5 ml 2x MDE
0,5 ml 5x TBE
100 µl APS 10%
20 µl TEMED

3.2.4 Medien für die Zell-/Bakterienkultur

PBS-Dulbecco, Seromed® Biochrom KG, Berlin, D.

RPMI 1640 mit L-Glutamin, PAA Laboratories GmbH, Linz, Österreich.

Foetal Calf Serum, PAA Laboratories GmbH, Linz, Österreich.

Penicillin (10.000 U/ml)/Streptomycin (10.000 µg/ml), Seromed® Biochrom KG, Berlin, D.

LB (Luria-Bertani) Medium, pH 7,0:

1%	Trypton, GIBCO BRL, Life Technologies, GmbH, Eggenstein, D.
0,5%	Hefe-Extrakt, GIBCO BRL, Life Technologies, GmbH, Eggenstein, D.
1%	NaCl
50 µg/ml	Ampicillin, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen, D.

Luria Agar (Miller's LB-Agar), GIBCO BRL, Life Technologies, GmbH, Eggenstein, D.

SOC-Medium:

2%	Trypton (GIBCO BRL, Life Technologies, GmbH, Eggenstein, D.)
0,5%	Hefe-Extrakt (GIBCO BRL, Life Technologies, GmbH, Eggenstein, D.)
0,05%	NaCl
2,5 mM	KCl
10 mM	MgCl ₂
20 mM	Glukose

3.2.5 Nukleinsäuren/Nukleotide

1Kb-DNA Ladder, GIBCO BRL, Life Technologies, GmbH, Eggenstein, D.

Deoxynucleoside Triphosphate Set, GIBCO BRL, Life Technologies, GmbH, Eggenstein, D.

Fluorescein RNA Labeling Mix, Boehringer-Mannheim, Mannheim, D.

Hexanukleotidgemisch, 10x konz., Boehringer-Mannheim, Mannheim, D.

Oligonukleotid-Primer, TIB MOLBIOL, Berlin, D.

3.2.6 Klonierung

Original TA-Cloning® Kit, Invitrogen, Groningen, Niederlande.

Eukaryotic TA Cloning® Kit – Unidirectional, Invitrogen, Groningen, Niederlande.

3.2.7 Zytokine

Murine Interleukin-3		TEBU GmbH, Frankfurt a. M., D.
Murine Interleukin-3		
Human Interleukin-4		

3.2.8 Nukleinsäureextraktion

RNeasy Total RNA Kit™		QIAGEN GmbH, Hilden, D.
QIAamp Blood Kit™		
Gel Extraction Kit™		
PCR Purification Kit™		
QIAprep Plasmid Mini Kit™		
QIAfilter Plasmid Maxi Kit™		
S.N.A.P.™ Total RNA Isolation Kit		Invitrogen, Groningen, Niederlande.

3.2.9 Enzyme

3.2.9.1 Restriktionsendonukleasen

Ball		Boehringer Mannheim GmbH, Mannheim, D.
EcoRI		
SspBI		
AccI		
PvuII		New England Biolabs GmbH., Schwalbach/Taunus, D.

3.2.9.2 DNA-Polymerasen

AmpliTaq® DNA-Polymerase, Perkin-Elmer, Applied Biosystems GmbH, Weiterstadt, D.

TaKaRa LA Taq DNA-Polymerase, TaKaRa Shuzo Co., LTD, Shiga, Japan.

Expand™ HF PCR System enzyme mix, Boehringer Mannheim GmbH, Mannheim, D.

3.2.9.3 Weitere Enzyme

SuperScript II™ H⁻ Reverse Transkriptase, GIBCO BRL, Life Technologies, GmbH, Eggenstein, D.

DNase I, RNase-frei, Boehringer Mannheim GmbH, Mannheim, D.

RNase T1, Boehringer Mannheim GmbH, Mannheim, D.

3.2.10 Antikörper

Anti human IL-4R α -Antikörper (anti CD124), Klon S456C9, PE-konj., Coulter-Immunotech Diagnostics, Hamburg, D.

Maus-IgG1-PE, B&D, Becton Dickinson, Immunocytometry Systems, San José, CA, USA.

Anti-human IL-4R polyclonal antibody, R&D Systems GmbH, Wiesbaden, D.

Annexin V/FITC Kit, Bender MedSystems, Wien, Österreich.

3.2.11 Sequenzierung

ThermoSequenaseTM dye terminator cycle sequencing pre-mix kit, Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg, D.

3.2.12 RNase-Protection-Assay

RiboQuantTM, RPA-Kit, PharMingen GmbH, Hamburg, D

3.2.13 Zellproliferation

CellTiter 96TM AQueous Non-Radioactive Cell Proliferation Assay, Promega, Madison, USA

3.2.14 Software

ABI PRISMTM DNA Sequencing Analysis Software, PerkinE, Applied Biosystems GmbH, Weiterstadt, D.

GeneScan Analysis-Software Version 1.2.2-1, Perkin-Elmer, Applied Biosystems GmbH, Weiterstadt, D.

WinMDI Version 2.8, Flow Cytometry Application, Joseph Trotter.

CellQuest Version 3.1f, Becton Dickinson, Immunocytometry Systems, San José, CA, USA.

Molecular Analyst® /PC, UV Gel Documentation, Bio-Rad Laboratories, Hercules, Ca, USA.

SPSS for Windows, Release 7.0.

Microsoft® Word 97

Microsoft® Excel 97

3.2.15 Geräte

Brutschränke:

Heraeus Instruments, Berlin, D.

Durchflußzytometer:

FACScan™ Flowzytometer, B&D, Becton Dickinson, Immunocytometry Systems, San José, CA, USA.

Elektrophoresekammern:

Wide Mini Sub® Cell, Bio-Rad Laboratories GmbH, München, D.

Elektroporator:

Gene Pulser, Bio-Rad Laboratories GmbH, München, D.

Gel-Dokumentationssystem:

Gel Doc 1000™, Bio-Rad Laboratories GmbH, München, D.

Kamera:

Polaroid CU-5 Nahaufnahme-Kamera, Polaroid, Offenbach/Main, D.

Mikroskope:

Carl Zeiss, Jena, D.

Plattenphotometer:

Dynatech MR5000 Microplate Reader, MTX Lab Systems Inc., Vienna, VA, USA.

Power Supply:

Power Pack P25, Biometra, Göttingen, D.

Schüttelinkubator:

Certomat® R/Certomat® H, B. Braun Biotech International, Melsungen, D.

Sequenzierer:

ABI Prism™ 373 und 377 Automatic Sequencer, Perkin-Elmer, Applied Biosystems GmbH, Weiterstadt, D.

Sterilbank:

LaminAir® HBB 2436, Heraeus Instruments, Berlin, D.

Thermo-Cycler:

DNA-Engine, Peltier Thermal Cycler, Model PTC-200, MJ Research Inc., Watertown, MA, USA.

GeneAmp® PCR System 2400, Perkin-Elmer, Applied Biosystems GmbH, Weiterstadt, D.

Filme:

Land Pack Filme Typ 667 (36 DIN), Polaroid Co., Cambridge, Mass., USA.

UV-Transilluminator:

TFX-20M, Fröbel Labor Technik GmbH, Berlin, D.

Zentrifugen:

Labofuge 400R, Heraeus Instruments, Berlin, D.

Megafuge 1.0, Heraeus Instruments, Berlin, D.

3.3 Statistische Auswertung

Die graphische Darstellung der Werte für sAUC ($IL-4R_{\alpha IT}$) der Patientengruppen erfolgte in Boxplots. In einem Boxplot sind die Werte einer Gruppe basierend auf der Darstellung von Median, Quartilen und Extremwerten zusammengefaßt. Die Box stellt den interquartilen Bereich dar, der 50% aller Werte enthält, die Linie durch die Box bezeichnet den Median. Die „Antennen“ umfassen den Bereich vom Rand der Box bis zum höchsten bzw. niedrigsten Wert, abgesehen von „Ausreißern“ und „Extremen“. „Ausreißer“ sind als Kreise dargestellt und bezeichnen Werte, deren Abstand vom oberen bzw. unteren Rand der Box 1,5 bis 3 Box-Längen beträgt. „Extreme“ sind mehr als 3 Box-Längen entfernt, und werden als Sternchen dargestellt.

Als statistische Tests wurden der Mann-Whitney-U Test, der Kruskal-Wallis Test und der Wilcoxon-rank Test eingesetzt. Die Berechnungen erfolgten mit der Software SPSS for Windows, Release 7.0. Statistische Auswertungen mit $p < 0,05$ wurde als signifikant gewertet.

3.4 Allgemeine Methoden

3.4.1 Zellkultur

Alle Zelllinien wurden in RPMI 1640 mit Glutamin (PAA Laboratories GmbH) unter Zusatz von 10% fetalem Kälberserum (PAA Laboratories GmbH) 100 U/ml Penicillin und 100 µg/ml Streptomycin (Seromed, Biochrom KG) bei 37°C in wassergesättigter Atmosphäre mit 5% CO₂ kultiviert.

Das Medium für die Kultivierung der Zelllinie Ba/F3 enthielt zusätzlich 5 ng/ml mL-3 (TEBU).

3.4.2 Isolierung der mononukleären Zellen

Durch Zentrifugation über einen Ficoll-Dichte-Gradienten (Seromed, Biochrom KG, Dichte 1.077 g/ml) wurden die mononukleären Zellen der Knochenmark- und Blut-Proben von Patienten und gesunden Probanden angereichert.

3.4.3 RNA/DNA-Extraktion

Gesamt-RNA und DNA der Proben wurden mit dem RNeasy Total RNA Kit™ bzw. dem QIAamp Blood Kit™ (beide von Qiagen) nach den Anweisungen des Herstellers isoliert.

3.4.4 Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR), Reverse Transcription PCR (RT-PCR)

Die Polymerase-Ketten-Reaktion (*polymerase chain reaction*, PCR) ist eine Technik zur zyklischen Amplifizierung bestimmter DNA-Bereiche. Nach Denaturierung der DNA und damit Trennung der gebildeten Doppelstränge lagert sich bei geeigneten Temperaturen ein Paar spezifischer Oligodesoxynukleotide (Primer), das die nachzuweisenden DNA-Region flankiert, der DNA an (*annealing*) und initiiert die Synthese des jeweils komplementären DNA-Stranges durch eine thermostabile DNA-Polymerase (Elongation). Weitere Zyklen mit den jeweiligen Schritten Denaturierung, Primer-*annealing* und Elongation schließen sich an. Da sich idealerweise die synthetisierten DNA-Fragmente mit jedem Zyklus verdoppeln, resultiert eine exponentielle Vermehrung des PCR-Produktes. Nach gelelektrophoretischer Auftrennung stellen sich die PCR-Fragmente als Bande dar. Durch Färbung des Geles mit Ethidiumbromid, einem Farbstoff, der mit DNA interkaliert und bei Licht einer Wellenlänge von 256 nm fluoresziert, können die Banden im UV-Licht sichtbar gemacht werden.

Die Umschreibung von RNA in komplementäre DNA (cDNA) gibt die Möglichkeit, durch Amplifizierung von cDNA-Fragmenten mit der Methode der PCR indirekt auch RNA-Bereiche nachzuweisen.

Die Reaktionsansätze und -bedingungen der in dieser Arbeit durchgeführten PCR's und RT-PCR's sind im speziellen Methodenteil ab Abschnitt 3.5 beschrieben. Die in den unterschiedlichen PCR-Ansätzen verwendeten Primer (TIB MOLBIOL, Berlin) und ihre Sequenzen sind in der Tabelle 1 aufgeführt.

Tab. 1: Positionen und Sequenzen der verwendeten Primer: Die Zahlen bezeichnen die Position des 5'-Nukleotids des Primers in der mRNA-Sequenz des IL-4R α gemäß der von Idzerda et al. veröffentlichten Sequenz [124].

*Primer zur spezifischen Amplifikation ausschließlich von IL-4R α_{IT} , überspannt Exon x.

#Primer zur Sequenzierung von pCR®3.1/IL-4R α und pCR®3.1/IL-4R α_{IT} , im Kit zum Vektor von der Firma Invitrogen mitgeliefert.

Primer, Position	5' Sequenz 3'
IL-4R 16 up	GGCGCGCAGATAATTAAAGATT
IL-4R 125 up	ATCACTTGAGATCAGGAGTTCTGA
IL-4R 617 up	CCCCCTGACAATTACCTGT
IL-4R 767 down	TGTAGGAAATCCCAGACTTC
IL-4R 950 up	AAGAAAGAATGGTGGGATCAGAT
IL-4R 1030 up	ACAGTGGGAGAAGCGGTC
IL-4R 1074 down	GGGCACTTGGCTGGTTCCT
IL-4R 1089IT* down	CAATTCTTCCAGTGTCTGAG
IL-4R 1118 down	CCAGAAAACAGGGCAAGAG
IL-4R 1242 up	TCAGCGTGGTGCGATGTGT
IL-4R 1384 down	CACAATGCCCTCCCTTCC
IL-4R 1619 up	CTGACTTGACAGAGACGC
IL-4R 2246 down	TTGGCATGTCCTCTACCTT
IL-4R 2582 down	AGGGGCAGGATGGAAGGAT
IL-4R 2792 down	GGGCCAATCACCTTCATACCAT
IL-4R 3065 down	TCGGCTTCTAGTTCAGTGAGA
GAPDH up [122]	GCAGGGGGGAGCCAAAAGGG
GAPDH down [122]	TGCCAGCCCCAGCGTCAAAG
β -Actin up [123]	CCTTCCTGGGCATGGAGTCCT
β -Actin down [123]	AATCTCATCTTGTTTTCTGCG
IL-15 up	TGTCTTCATTTTGGGCTGTTTCA
IL-15 down	TCCTCCAGTTCCTCACATTCTTTG
IL-7 up	CCCGCAGACCATGTTCCATG
IL-7down	GAGGATGCAGCTAAAGTTCTG
IL-7R up	CTCCAGAGATCAATAATAGCTC
IL-7R down	TTGTGCTCACGGTAAGTTCA
γ_C up	AAAACTGCAGAATCTGGTGATCCC
γ_C down	GGTGGGAATTCGGGGCATCGTC
β_C up	TGCGCAGAAAGTGGGAGGAGAAGA
β_C down	GCCTTCTCTCCACTTCCACG
T7 [#]	TAATACGACTCACTATAGGG
pCR®3.1 Reverse [#]	TAGAAGGCACAGTCGAGG

3.4.4.1 cDNA-Synthese

Die Reaktion der reversen Transkription zur Generierung von komplementärer DNA (cDNA) wurde bei 37°C für 45 min und anschließender Hitzeinaktivierung der Reversen Transkriptase bei 94°C für 5 min in folgendem Ansatz durchgeführt:

ca. 1 µg	RNA
4 µl	First Strand Buffer (5x konz.), GIBCO BRL
5 µl	dNTP-Mix (je 2 mM), GIBCO BRL
1 µl	DTT (100 mM), GIBCO BRL
2 µl	Hexanukleotide (50 mM), Boehringer Mannheim
2 µl	SuperScript IITM H- Reverse Transkriptase (200 U/µl), GIBCO BRL
<hr/>	
H ₂ O ad 20 µl	

3.4.4.2 Agarose-Gelelektrophorese

10 µl-Aliquots eines jeden PCR-Produktes wurden nach elektrophoretischer Auftrennung in mit Ethidiumbromid (200 µg/l) gefärbten 0,6-3%igen Agarose-Gelen (NuSieve GTG:SeaKem GTG (2:1) für 3%ige Gele, SeaKem LE für 0,6-2%ige Gele, Biozym Diagnostics GmbH) analysiert.

3.4.5 Aufreinigung von PCR-Produkten

Aufreinigungen von PCR-Produkten wurden mit dem PCR Purification Kit (Qiagen) nach den Anweisungen des Herstellers durchgeführt. Die Amplifikate der aus Agarose-Gelen herausgeschnittenen Banden wurden mit dem Gel Extraction Kit (Qiagen) aufgereinigt.

3.4.6 Sequenzierungen

3.4.6.1 Cycle-Sequencing

Die PCR-Produkte bzw. Plasmide wurden mit dem „ThermoSequenase™ dye terminator cycle sequencing pre-mix kit“ (Amersham) sequenziert. Die Methode des *Cycle Sequencing* basiert auf dem Prinzip der PCR, wobei allerdings im Unterschied zur PCR nur ein Primer eingesetzt wird. Durch den Einsatz einer hitzestabilen DNA-Polymerase können durch wiederholte Zyklen von Hitzedenaturierung des *Templates*, Primer-Anlagerung und Elongation größere Mengen von Produkt erzielt werden als bei Sequenzierungen mit hitzeempfindlichen Polymerasen wie z. B. der T7 Sequenase, die nur einen einzigen Polymerisierungsschritt erlauben.

Der Einbau eines Didesoxynukleotids (ddNTP) in den DNA-Strang verhindert eine weitere Polymerisierung, so daß es an dieser Stelle zum Kettenabbruch kommt. Die vier verschiedenen ddNTPs sind jeweils mit unterschiedlichen Fluoreszenzfarbstoffen markiert. Nach gelelektrophoretischer Auftrennung, die die Fragmente nach ihrer Größe separiert,

können die Farben von einem geeigneten Detektor erkannt werden und jedem Fragment kann ein bestimmtes Nukleotid zugeordnet werden. Die Gelelektrophorese, Detektion und Analyse der Sequenzierungen wurden mit dem automatischen Sequenzierer ABI Prism™ 377 (PE, Applied Biosystems, Weiterstadt) durchgeführt.

Cycle-Sequencing-Ansatz

Plasmid-Sequenzierung:

ca. 500 ng	Plasmid
5 pmol	Primer
4 µl	ThermoSequenase™ dye terminator pre-mix, Amersham
<hr/>	
	H ₂ O ad 10 µl

Direkte Sequenzierung eines PCR-Produktes:

ca. 200 ng	PCR-Produkt
5 pmol	Primer
2 µl	ThermoSequenase™ dye terminator pre-mix, Amersham
<hr/>	
	H ₂ O ad 10 µl

Reaktionsbedingungen

initiale Denaturierung: 94°C	2 min	
Annealing: 55°C	15 sec	25 Zyklen
Elongation: 65°C	30 sec	
Denaturierung: 94°C	15 sec	

Die *Cycle-Sequencing*-Reaktionen wurden im Thermocycler GeneAmp® PCR System 2400 (PE, Applied Biosystems) durchgeführt. Durch Zentrifugation über Sephadex-Säulen (Sephadex G50, Pharmacia Biotech) wurden die Produkte von den überschüssigen Primer- und Nukleotid-Resten abgetrennt und in einer Vakuumzentrifuge getrocknet. Die Pellets wurden in 4 µl Ladepuffer gelöst und nach Denaturierung für 2 min bei 94°C auf Eis gestellt. 2 µl der Probe wurden für die weitere Analyse auf das Gel geladen.

3.4.6.2 Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Die Produkte wurden in einem Polyacrylamid-Gel (5% Acrylamid:Bisacrylamid (29:1), 7 M Harnstoff) im ABI Prism™ 377 aufgetrennt und analysiert.

3.4.7 Restriktionsverdaue

Verdaue mit Restriktionsendonukleasen wurden unter den entsprechenden Pufferbedingungen mit je ca. 1-2 U Enzym pro µg DNA bei 37°C für 1-4 Stunden durchgeführt.

3.4.8 Single Stranded Conformational Polymorphism (SSCP) Analyse

Die SSCP-Analyse beruht auf dem Prinzip, daß einzelsträngige DNA-Fragmente in einem nicht-denaturierenden Milieu entsprechend ihrer Primärstruktur sekundäre Konformationen annehmen, die das Laufverhalten in einem hochauflösenden Polyacrylamid-Gel beeinflussen, so daß mit dieser Methode bei geeigneten Versuchsbedingungen Punktmutationen detektiert werden können. Durch eine initiale Hitze-Denaturierung in Formamid werden die Doppelstränge eines PCR-Produktes in Einzelstränge getrennt. Diese bilden dann bei Auftrennung im nicht-denaturierenden Gel entsprechend ihren Laufeigenschaften ein spezifisches Bandenmuster, das mittels einer hochsensitiven Silberfärbung sichtbar gemacht werden kann.

Die Methode der SSCP wurde in der vorliegenden Arbeit angewandt, um die bei der kompetitiven PCR von IL-4R α /IL-4R α_{IT} (siehe Abschnitt 3.5.1 und Abb. 11) auftretende zusätzlichen Bande als Heteroduplexe zu identifizieren (siehe auch Abschnitt 3.5.3 und Abb. 18).

Zur Durchführung der SSCP wurden 5 μ l der aus dem Gel extrahierten Amplifikate mit 15 μ l SSCP-Ladepuffer gemischt, nach Denaturierung über 10 Minuten sofort auf Eis gestellt und auf ein 0,7x MDE-Gel geladen. Die Elektrophorese erfolgte in 0,5x TBE als Laufpuffer bei einer elektrischen Leistung von 4 Watt während der ersten 15 Minuten, anschließend über einen Zeitraum von 15-18 Stunden bei 2 Watt. Um die Banden nach Abschluß der Elektrophorese durch eine Silberfärbung sichtbar zu machen, wurde das Gel zunächst fixiert, anschließend in 0,1% Silbernitrat 10 Minuten inkubiert, gewaschen und in der Entwicklerlösung geschwenkt bis die Banden sichtbar wurden. Die Entwicklung wurde in 10% Essigsäure gestoppt.

3.4.9 Durchflußzytometrie

Die Durchflußzytometrie ist ein Meßverfahren zur Untersuchung von Partikeln wie z.B. Zellen in wässriger Suspension. Die Zellen werden im Durchflußzytometer in einem Flüssigkeitsstrom wie in einer Perlenkette aufgereiht durch eine Meßkammer geleitet und dort dem Meßpunkt, dem Kreuzungspunkt mit einem Laserstrahl zugeführt. Das an der Zelle entstehende Streulicht wird in verschiedenen Winkeln ausgewertet. Das im Engwinkel gemessene Streulicht (*forward scatter*) ist ein Maß für die Größe der Zellen, während das seitwärts im rechten Winkel gemessene Streulicht die Zellgranularität bestimmt. Zusätzlich kann die Fluoreszenz der Zellen gemessen werden. Dazu werden die Zellen entweder direkt mit Fluorochromen angefärbt (z.B. Propidiumjodid als Kernfarbstoff) oder sie werden mit Fluoreszenz-markierten Antikörpern beladen. Die verwendeten Fluoreszenzfarbstoffe

müssen ihr Absorptionsmaximum im Bereich der Wellenlänge des Lasers haben, das Emissionsspektrum hängt von der Art des eingesetzten Farbstoffes ab. Der Einsatz von Farbstoffen mit unterschiedlichem Emissionsspektrum macht die simultane Messung mehrerer Antikörper bzw. die Kombination von Antikörpermarkierung mit der direkten Färbung der Zellen möglich.

Die in dieser Arbeit durchgeführten durchflußzytometrischen Messungen wurden mit dem FacScan der Firma Becton-Dickinson durchgeführt.

3.4.10 Klonierung

3.4.10.1 Unidirektionales TA-Cloning

Das Prinzip des TA-Cloning (Original TA-Cloning®, Eukaryotic TA Cloning® Kit - Unidirectional, Invitrogen) beruht auf der Eigenschaft der Taq-Polymerase, an das 3'-Ende jedes bei der PCR-Amplifikation entstehenden Stranges ein einzelnes A-Nukleotid anzufügen. Der Vektor ist bereits linearisiert und mit jeweils einem T-Nukleotid-Überhang an seinen 3'-Enden versehen. Dadurch werden „sticky ends“ passend zu den 3'A-Überhängen der PCR-Produkte geschaffen und die Selbstligation des Vektors verhindert.

Der TA-Cloning-Vektor pCR3.1™-Uni (Eukaryotic TA Cloning® Kit - Unidirectional, Invitrogen) ist ein eukaryontischen Expressionsvektor, der zusätzlich die gerichtete Klonierung von PCR-Produkten ermöglicht. Für diesen Zweck trägt das eine 5'-Ende des Vektors keine Phosphatgruppe, was eine Ligation mit einem Ende eines DNA-Stranges, der ebenfalls keine 5'-Phosphatgruppe trägt, verhindert. Durch vorhergehende Phosphorylierung eines der beiden Primer, die bei der PCR zur Herstellung des Inserts eingesetzt werden, kann das Insert jedoch in der gewünschten Orientierung in den Vektor eingebaut werden (Abb. 7).

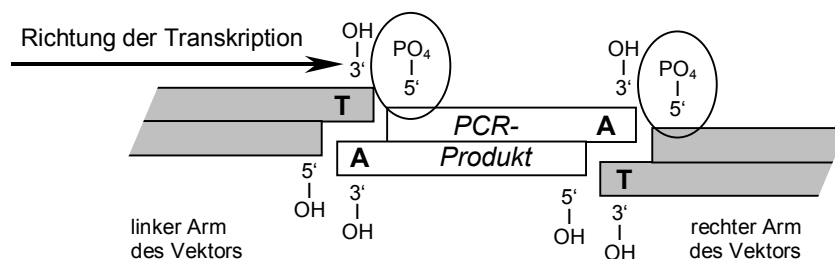


Abb. 7 Schematische Darstellung des unidirektionalen TA-Cloning-Vektors für die gerichtete Ligation des PCR-Produktes mit dem Vektor. Da die Ligase ein phosphoryliertes 5'-Ende für die Ligation benötigt, ist bei Dephosphorylierung eines Armes des Vektors und Phosphorylierung eines der beiden Enden des PCR-Produktes die Ligation nur in einer Richtung möglich.

Die Phosphorylierung eines Primers und die anschließende Ligation der Inserts mit dem Vektor erfolgten nach den Anweisungen des Herstellers der eingesetzten TA-Cloning®-Kits.

3.4.10.2 Phosphorylierung eines Primers

0,1 nmol	Primer <i>IL-4R</i> 125 up
1 µl	10x Kinase Puffer
1 µl	ATP (10 mM)
1 µl	T4-Polynukleotid-Kinase (10 U/µl)
<hr/>	
	H ₂ O ad 10 µl

Der Ansatz wurde für 40 min bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde die Kinase für 5 min bei 94°C inaktiviert, der Ansatz auf Eis gestellt und sofort in der PCR weiterverwendet.

3.4.10.3 Transformation kompetenter *E. coli*

Kompetente Zellen des *E. coli*-Stammes TOP10F' (One Shot™, Invitrogen) wurden mit den fertigen Ligationsansätzen transformiert.

Die Zellen wurden auf Eis aufgetaut und mit 2 µl β-Mercaptoethanol und 1-2 µl des Ligationsansatzes gemischt. Nach Inkubation für 30 min auf Eis wurden die Zellen für 30 sec einem Hitzeschock bei 42°C ausgesetzt, kurz auf Eis abgekühlt und dann für 60 min in 250 µl SOC-Medium bei 37°C und 225 UpM auf einem Rotations-Schüttler geschüttelt. Anschließend wurden je 50 µl und 250 µl des Ansatzes auf Luria-Agar-Platten mit Ampicillin ausgestrichen und über Nacht bei 37°C inkubiert.

3.4.10.4 Plasmidpräparationen

Für die Plasmid-Minipräparationen wurde je eine Kolonie einer Übernachtplatte gepickt und in 2 ml Ampicillin-LB-Medium für ca. 16 h bei 37°C geschüttelt. Die Isolierung der Plasmide wurde mit dem QIAprep Plasmid Mini Kit (Qiagen) nach den Anweisungen des Herstellers durchgeführt. Die Bakterien werden nach alkalischer Lyse über Säulen mit einer DNA-bindenden Silica-Matrix aufgereinigt.

Plasmidpräparationen mit ausreichender Reinheit und Menge für die nachfolgenden Transfektionen wurden mit dem QIAfilter Plasmid Maxi Kit (Qiagen) nach den Angaben des Herstellers durchgeführt.

3.5 Identifizierung und Charakterisierung der IL-4R α Splice-Variante (IL-4R α_{IT})

3.5.1 PCR

Für die Identifizierung und die folgende Sequenzierung der IL-4R α_{IT} wurde eine PCR mit dem Primerpaar *IL-4R 617 up/IL-4R 1118 down* (Tab. 1) durchgeführt.

Reaktionsansatz

ca. 1 μ l	cDNA-Mix
3 μ l	PCR-Buffer (10x konz.), PERKIN ELMER
0,1 μ l	AmpliTa q ® DNA-Polymerase (5 U/ μ l), PERKIN ELMER
3 μ l	dNTP-Mix (je 2 mM), GIBCO BRL
1,5 μ l	je Primer <i>IL-4R 617 up/IL-4R 1118 down</i> (10 μ M), TIB MOLBIOL
<hr/>	
	H $_2$ O ad 30 μ l

Reaktionsbedingungen

initiale Denaturierung: 94°C 5 min	
Annealing: 58°C 45 sec	30 Zyklen
Elongation: 72°C 60 sec	
Denaturierung: 94°C 60 sec	
abschließende Elongation: 72°C 10 min	

Bei der Untersuchung der Patientenproben wurden die gleichen Reaktionsbedingungen verwendet. Der Reaktionsansatz enthielt aber zusätzlich 0,15 μ l je β -Actin-spezifischem Primer als interne Kontrolle.

3.5.2 Sequenzierung

Nach Agarose-Gelelektrophorese wurden die Banden für den IL-4R α und die IL-4R α_{IT} aus dem Gel herausgeschnitten, die Amplifikate aufgereinigt und nach der in Abschnitt 3.4.5 beschriebene Methode direkt sequenziert.

3.5.3 SSCP

Zur Identifizierung der Heteroduplexe wurden die Banden von IL-4R und IL-4R α_{IT} und die Heteroduplex-Bande nach elektrophoretischer Auftrennung in einem Agarose-Gel einzeln aus dem Gel herausgeschnitten, aufgereinigt und in einer SSCP-Analyse das Laufverhalten der Einzelstränge ermittelt.

3.5.4 Quantitative Analyse

Mit Hilfe eines Gel-Dokumentationssystems (Gel Doc 1000™) und der Molecular Analyst® Software (beide von Bio-Rad Laboratories) konnte die Intensität der Banden dokumentiert und analysiert werden. Für jede Probe wurde ein Profil erstellt, bei dem die Fläche unter der Kurve (AUC) eines jeden Peaks der Intensität der dazugehörigen Bande entspricht (Abb. 19). Die AUC's der Peaks von IL-4R α und IL-4R α_{IT} wurden bestimmt, und als Maß für die Expression der Splice-Variante im Verhältnis zum IL-4R α wurde eine standardisierte AUC für die Splice-Variante (sAUC(IL-4R α_{IT})) nach der Formel

$$\text{sAUC(IL-4R}\alpha_{IT}) = \frac{\text{AUC(IL-4R}\alpha_{IT})}{\text{AUC(IL-4R}\alpha + \text{AUC(IL-4R}\alpha_{IT}))} \times 100 \text{ in \% berechnet.}$$

3.5.5 Identifizierung der Grenzen des alternativ gespleißten Exons

3.5.5.1 PCR

Zur Identifizierung der Grenzen des alternativ gespleißten Exons wurde eine Intron-überspannende PCR mit DNA aus mononukleären Zellen peripheren Blutes eines gesunden Probanden durchgeführt. Die verwendeten Primerpaare waren *IL-4R 950 up/IL-4R 1074 down* für das Intron upstream des alternativ gespleißten Exons und *IL-4R 1030 up/IL-4R 1118 down* (Tab. 1) für das Intron downstream davon. Es gelang, die gesamten Introns unter den folgenden PCR-Bedingungen zu amplifizieren.

Reaktionsansatz

ca. 0,1 µl	buffy coat DNA
3 µl	LA PCR-Buffer II (Mg ²⁺ plus, 10x konz.), TaKaRa Shuzo Co., LTD.
0,3 µl	TaKaRa LA Taq DNA-Polymerase (5 U/µl), TaKaRa Shuzo Co., LTD.
6 µl	dNTP-Mix (je 2 mM), GIBCO BRL
1 µl	je Primer <i>IL-4R 1030 up/IL-4R 1118 down</i> bzw.
	<i>IL-4R 950 up/IL-4R 1074 down</i> , (10 µM) TIB MOLBIOL
<hr/>	
	H ₂ O ad 30 µl

Reaktionsbedingungen

initiale Denaturierung:	94°C 5 min	
Annealing:	60°C 45 sec	35 Zyklen
Elongation:	72°C 3 min	
Denaturierung:	94°C 60 sec	
abschließende Elongation:		72°C 10 min

Die Länge der PCR-Produkte betrug ca. 1500 bp für das Intron oberhalb und ca. 1800 bp für das Intron unterhalb des alternativ gespleißten Exons.

3.5.5.2 Sequenzierung

Die Produkte wurden wie oben beschrieben aufgereinigt und je etwa 400 bp der 5'- und der 3'-Enden der Amplifikate wurden direkt sequenziert.

3.5.6 mRNA-Stabilitäts-Test

Zur Bestimmung der mRNA-Stabilitäten von IL-4R und IL-4R_{IT} wurden mononukleäre Zellen peripheren Blutes eines gesunden Probanden in 5 Portionen (Nr. 1-5) zu je 1×10^7 Zellen geteilt. Aus Portion Nr. 1 wurde sofort RNA gewonnen, Nr. 2 und 3 wurden am zweiten Tag und Nr. 4 und 5 am vierten Tag nach Abnahme aufgearbeitet. Die Zellen aus den Portionen 2-5 wurden bis zur Aufarbeitung in 4 ml RPMI-Medium bei Zimmertemperatur aufbewahrt. Die Portionen 2 und 4 enthielten zusätzlich 10 µg/ml Actinomycin D (Sigma-Aldrich) zur Hemmung der Transkription.

3.5.6.1 Kompetitive RT-PCR

Um das Verhältnis der Expression von IL-4R α - zu IL-4R α_{IT} -mRNA zu bestimmen, wurde eine kompetitive RT-PCR wie im Abschnitt 3.5.1 beschrieben durchgeführt.

3.5.6.2 Semiquantitative RT-PCR

Die Expression der einzelnen Transkripte von IL-4R α und IL-4R α_{IT} wurde mit semiquantitativen RT-PCRs mit jeweils für die einzelnen Transkripte spezifischen Primern in folgenden Ansätzen durchgeführt.

Reaktionsansatz für IL-4R α

ca. 1 μ l cDNA-Mix
 3 μ l PCR-Buffer (10x konz.), PERKIN ELMER
 0,1 μ l AmpliTaq® DNA-Polymerase (5 U/ μ l), PERKIN ELMER
 3 μ l dNTP-Mix (je 2 mM), GIBCO BRL
 1 μ l je Primer *IL-4R 1030 up/IL-4R 1384 down* (10 μ M)
 H₂O ad 30 μ l

Reaktionsansatz für IL-4R α_T

ca. 1 μ l cDNA-Mix
 3 μ l PCR-Buffer (10x konz.), PERKIN ELMER
 0,1 μ l AmpliTaq® DNA-Polymerase (5 U/ μ l), PERKIN ELMER
 3 μ l dNTP-Mix (je 2 mM), GIBCO BRL
 1,5 μ l je Primer *IL-4R 617 up/IL-4R 1089IT down* (10 μ M)
 H₂O ad 30 μ l

Reaktionsansatz für GAPDH

ca. 1 μ l cDNA-Mix, 1:1 bis 1:100 verdünnt
 3 μ l PCR-Buffer (10x konz.), PERKIN ELMER
 0,1 μ l AmpliTaq® DNA-Polymerase (5 U/ μ l), PERKIN ELMER
 3 μ l dNTP-Mix (je 2 mM), GIBCO BRL
 1, 5 μ l je Primer *GAPDH up/down* (10 μ M)
 H₂O ad 30 μ l

Reaktionsbedingungen für IL-4R α , IL-4R α_T und GAPDH

initiale Denaturierung: 94°C 5 min

Annealing: 59°C 30 sec	30 Zyklen
Elongation: 72°C 45 sec	
Denaturierung: 94°C 60 sec	

abschließende Elongation: 72°C 10 min

3.6 Klonierung von IL-4R α - und IL-4R α_T -cDNA**3.6.1 PCR zur Herstellung der Inserts**

Die gesamten kodierenden Bereiche des IL-4R α und der IL-4R α_T wurden mit einer sogenannten *nested* PCR amplifiziert. Hierbei wird ein PCR-Produkt als *template* in einem weiteren PCR-Ansatz eingesetzt und mit intern (*nested*) gelegenen Primern amplifiziert. Dadurch werden die Ausbeute erhöht und gleichzeitig im externen PCR-Ansatz entstandene unspezifische Produkte durch den Einsatz der *nested* gelegenen Primer im internen Ansatz nicht weiter amplifiziert.

Die externe PCR wurde mit dem Primerpaar *IL-4R 16 up/IL-4R 3065 down* (Tab. 1) durchgeführt.

3.6.1.1 Externe PCR

Reaktionsansatz

ca. 0,1 µg	buffy coat cDNA
3 µl	Expand™ HF Puffer (Mg ²⁺ plus, 10x konz.), Boehringer Mannheim
0,75 µl	Expand™ HF PCR System enzyme mix (3,5 U/µl), Boehringer Mannheim
6 µl	dNTP-Mix (je 2 mM), GIBCO BRL
1 µl	je Primer <i>IL-4R 16 up/IL-4R 3065 down</i> (10 µM) TIB MOLBIOL
<hr/>	
	H ₂ O ad 30 µl

Reaktionsbedingungen

initiale Denaturierung: 94°C 2 min	
Annealing: 58°C 30 sec	10 Zyklen
Elongation: 68°C 3 min	
Denaturierung: 94°C 30 sec	
Annealing: 58°C 30 sec	20 Zyklen
Elongation: 68°C 3 min+20 sec/Zyklus	
Denaturierung: 94°C 30 sec	
abschließende Elongation: 72°C 7 min	

Für die interne PCR wurde das Produkt der externen PCR 1:10⁴ verdünnt und mit dem Primerpaar *IL-4R 125 up/IL-4R 2793 down* (Tab. 1) amplifiziert. Um eine anschließende gerichtete Klonierung in den Vektor pCR3.1TM-Uni zu ermöglichen, wurde der Sense-Primer *IL-4R 125 up* zuvor phosphoryliert (siehe 3.4.10.1.)

3.6.1.2 Interne PCR

Reaktionsansatz

1 µl	Produkt der externen PCR, 1:10 ⁴ verdünnt
3 µl	Expand™ HF Puffer (Mg ²⁺ plus, 10x konz.), Boehringer Mannheim
0,5 µl	Expand™ HF PCR System enzyme mix (3,5 U/µl), Boehringer Mannheim
6 µl	dNTP-Mix (je 2 mM), GIBCO BRL
1 µl	je Primer <i>IL-4R 125 up (phosph.)/IL-4R 2793 down</i> , (10 µM), TIB MOLBIOL
<hr/> H ₂ O ad 30 µl	

Reaktionsbedingungen

initiale Denaturierung: 94°C 2 min		
Annealing: 64°C 30 sec		10 Zyklen
Elongation: 68°C 3 min		
Denaturierung: 94°C 30 sec		
Annealing: 64°C 30 sec		20 Zyklen
Elongation: 68°C 3 min+20 sec/Zyklus		
Denaturierung: 94°C 30 sec		
abschließende Elongation: 72°C 7 min		

Die Amplifikationsprodukte der internen PCR wurden in dem eukaryontischen Expressionsvektor pCR3.1™-Uni kloniert.

3.6.2 Ligation

Zur Klonierung wurden die Amplifikationsprodukte der IL-4R α - und IL-4R α_{IT} -cDNA zunächst mit dem Vektor pCR3.1™-Uni ligiert. Gewöhnlich wird in der Ligation ein molares Verhältnis von Vektor zu Insert von 1:1 bis 1:2 empfohlen. Für eine größere Effizienz der Ligation kann laut Hersteller bei langen Inserts der Einsatz einer größeren Menge PCR-Produkt in Relation zum Vektor nötig sein. Da trotz der *nested*-PCR die Ausbeute an PCR-Produkt relativ gering war, wurden zur Anreicherung die gewünschten Produkte mehrerer Ansätze aufgereinigt und in einem kleineren Volumen H₂O aufgenommen. Dieses Produkt wurde nach Zugabe von PCR-Puffer, dNTPs und Taq-Polymerase nochmals für 15 min bei 72°C inkubiert, um einen ausreichenden 3'-A-Überhang der Produkte und damit eine hohe Ligationseffizienz zu gewährleisten.

2 µl	Vektor (pCR3.1™-Uni), 30 ng/µl, Invitrogen
x µl	PCR-Produkt (ca. 100 ng)
1 µl	10x Ligationspuffer, Invitrogen
1 µl	T4 DNA-Ligase (4 U/µl), Invitrogen
<hr/> H ₂ O ad 10 µl	

Die Ligation fand bei 14°C über Nacht statt.

3.6.3 Transformation kompetenter E. coli-Stämme

Kompetente E. coli-Bakterien wurden wie im Abschnitt 3.4.10.3 beschrieben mit den Ligationsansätzen transformiert. Die Kolonien der Übernachtplatten wurden in je 2 ml LB-Ampicillin-Medium für ca. 16 h weiter kultiviert. Je 1 µl dieser Zellsuspensionen wurde mit 100 µl H₂O verdünnt und 1 µl davon als *template* in eine PCR eingesetzt, um zu kontrollieren, ob ein Insert und ob die IL-4R α - oder IL-4R α_{IT} -cDNA in die Klon integriert wurde. Die PCR wurde mit dem Primerpaar *IL-4R 617 up/IL-4R 1118 down* (Tab. 1) unter den im Abschnitt 3.5.1 beschriebenen Konditionen durchgeführt. Aus den Kulturen, deren Klon das gewünschte Insert integriert hatten, wurden die Plasmide wie in Abschnitt 3.4.10.4 beschrieben extrahiert.

3.6.4 Sequenzierung

Zur Kontrolle der korrekten Sequenz wurden die Inserts der Vektoren nach der im Abschnitt 3.4.5 beschriebenen Methode mit den in der Tabelle 1 aufgelisteten IL-4R α -Primern sequenziert.

3.6.5 Herstellung von pCR3.1/IL-4R α mit korrektem Insert

Da trotz Einsatzes einer DNA-Polymerase mit *proofreading*-Aktivität kein Klon von pCR3.1/IL-4R α mit fehlerfreiem Insert erhalten werden konnte, wurden die korrekten Bereiche zweier Vektoren mit Fehlern an jeweils unterschiedlichen Positionen des Inserts miteinander ligiert: Der Klon Nr. 24 hatte Fehler in seiner Basensequenz an den Positionen 487 und 887, der Klon Nr. 17 an Position 2001. Die Restriktionsendonuklease SspBI schneidet im Insert an Position 1785, Accl an Position 2185. Beide Enzyme schneiden an keinen weiteren Stellen im Vektor. Durch Verdau beider Klone mit beiden Restriktionsenzymen konnte der Bereich im Klon 17, der den Fehler an Position 2001 enthielt, herausgeschnitten und durch Ligation mit dem homologen, fehlerlosen Abschnitt aus Klon 24 ausgetauscht werden.

Die Produkte des Restriktionsverdaus wurden auf einem 1%igen Agarose-Gel elektrophoretisch aufgetrennt. Das kurze Fragment (=400 bp) aus Klon Nr. 24 und das lange Fragment (\approx 7270 bp) aus Klon Nr. 17 wurden aus dem Gel herausgeschnitten, mit dem QiAquick Gel Extraction Kit (Qiagen) aufgereinigt und religiert. Die erneute Sequenzierung dieses Vektors zeigte dann eine korrekte Basensequenz, so daß er in die folgenden Versuche eingesetzt wurde.

3.6.6 Plasmidpräparationen (Maxipreps)

Von den Klonen mit den korrekten IL-4R α - bzw. IL-4R α_{IT} -Inserts wurden wie in Abschnitt 3.4.10.4 beschrieben Maxipräparationen des Vektors hergestellt.

3.7 Transfektion der Zelllinie Ba/F3

Zellen der pro-B-Zelllinie Ba/F3 der Maus wurden mit PBS gewaschen und anschließend zu einer Konzentration von 1×10^7 vitalen Zellen in RPMI resuspendiert. Je 0,8 ml Zellsuspension wurden mit ca. 50 μ g mit PvuI linearisiertem Vektor (pCR3.1/IL-4R, pCR3.1/IL-4R $_{IT}$, pCR3.1) nach 5-minütiger Inkubation auf Eis bei 300 V und 950 μ F in einem Elektroporator (Gene Pulser, Bio-Rad Laboratories) elektroporiert. Die Zellen wurden in je 20 ml Ba/F3-Medium (s.o.) für 48 h kultiviert und anschließend die stabil transfizierten Zellen unter Zugabe von Geneticin® (G418) (Invitrogen) in einer Konzentration von 800 μ g/ml in 24-Loch-Platten für ca. 2-3 Wochen selektioniert. Um homogene, rezeptortragende Klone der mit pCR3.1TM-Uni-IL-4R bzw. pCR3.1TM-Uni-IL-4R $_{IT}$ transfizierten Zellen zu erhalten, wurden die stabil transfizierten Zellen auf eine Konzentration von ca. 10 Zellen/ml eingestellt und in 96-Loch-Platten mit je 100 μ l Zellsuspension pro *well* kultiviert. Die aus einer Einzelzelle entstandenen Klone wurden weiter expandiert und auf die Expression des IL-4R α /IL-4R α_{IT} bzw. deren mRNA mit Durchflußzytometrie, RT-PCR und RNase-Protection-Assay überprüft. 21 mit pCR3.1TM-Uni-IL-4R und 18 mit pCR3.1TM-Uni-IL4R $_{IT}$ transfizierte Klone, die durchflußzytometrisch den Rezeptor auf der Zelloberfläche und in der RT-PCR den gesamten kodierenden Bereich der IL-4R- bzw. IL-4R $_{IT}$ -mRNA exprimierten, wurden in den folgenden Experimenten weiter untersucht. Die mit dem leeren Vektor pCR3.1TM-Uni stabil transfizierten Zellen wurden ohne weitere Klonierung als negative Kontrolle eingesetzt.

3.8 Durchflußzytometrische Untersuchung der Expression von IL-4R und IL-4R $_{IT}$

Je 5×10^5 Zellen wurden in 100 μ l PBS mit 20 μ g Maus IgG (Sigma) zur Blockade unspezifischer Bindungen für 20 min und anschließend nach Zugabe von 20 μ l PE-konjugiertem monoklonalem anti-human IL-4R α -Antikörper (anti CD124, Immunotech) bzw. 5 μ l der passenden PE-konjugierten Isotyp-Kontrolle (Becton-Dickinson) für weitere 20 min bei 4°C inkubiert. Nach Waschen der Zellen in PBS wurden die Proben im Durchflußzytometer (FACScan, Becton-Dickinson) gemessen und die Ergebnisse mit der CellQuest-Software (Becton-Dickinson) und zur weiteren Bearbeitung unter Windows mit dem dem Programm WinMDI Version 2.8 ausgewertet.

3.9 Proliferations-Assays

3.9.1 Prinzip des MTS Zell-Proliferations-Test

Das Tetrazoliumsalz MTS (Owen's Reagenz) wird bei Zugabe von PMS (Phenazin-Methosulfat) als Elektronendonator durch die mitochondrialen Dehydrogenasen lebender Zellen zu einem wasserlöslichen Formazan reduziert, dessen Entstehung sich colorimetrisch durch sein Absorptionsmaximum bei 490 nm bestimmen läßt und zu der Zahl der lebenden Zellen in der Kultur proportional ist. Mit dem MTS Zell-Proliferations-Test (CellTiter 96™ AQueous Non-Radioactive Cell Proliferation Assay, Promega, Madison, USA) wurde in der vorliegenden Arbeit die Fähigkeit der mit IL-4R α bzw. IL-4R α_{IT} transfizierten Zellen gemessen, unter Stimulation mit humanem und murinem IL-4 zu proliferieren.

3.9.2 Durchführung des MTS Zell-Proliferations-Test

Je 2×10^4 Zellen/well wurden in 100 μ l Medium ohne bzw. nach Zugabe unterschiedlicher Konzentrationen von humanem oder murinem IL-4 in 96-well-Platten bei 37°C inkubiert. Nach 42 bis 48 h wurden den Zellen pro well 20 μ l einer Lösung aus 2 mg/ml MTS und 0,92 mg/ml PMS zugesetzt, und nach weiterer Inkubation der Platten für ca. 4-6 h bei 37°C die Entstehung des Formazans in einem Plattenphotometer mit einem Meßfilter von 490 nm und einem Referenzfilter von 720 nm gemessen. Die gemessenen Absorptionen (optische Dichte, O.D.) von jeweils 3 wells desselben Ansatzes wurden gemittelt und durch Subtraktion der gemittelten Absorption von wells mit Medium und MTS/PMS aber ohne Zellen korrigiert.

3.9.3 Proliferation nach Zugabe von spezifischem Antikörper gegen hIL-4R α

Je 2×10^4 Zellen/well wurden in 100 μ l Medium ohne und mit 0,5 μ g/ml polyklonalem Antikörper gegen humanen IL-4R (R&D Systems) für 1 h bei Zimmertemperatur inkubiert. Nach 42 h Wachstum dieser Zellen bei 37°C unter unterschiedlichen Konzentrationen von humanem oder murinem IL-4 wurde wie oben beschrieben die Proliferation gemessen.

3.10 Durchflußzytometrische Detektion apoptotischer Zellen

Während früher Stadien der Apoptose erscheint Phosphatidylserin (PS) auf der Außenseite der Zellmembran. Durch den Einsatz fluoreszenzmarkierter PS-bindende Proteine wie z.B. Annexin V-FITC können Zellen in diesem Stadium durchflußzytometrisch detektiert werden. Außerdem verliert die Zelle während der Apoptose zunehmend die Barrierefunktion ihrer Zellmembran, so daß der DNA-Farbstoff Propidiumjodid von der Zelle aufgenommen wird.

Apoptotische Zellen lassen sich daher mäßig, tote Zellen dagegen stark mit Propidiumjodid anfärben, während der Farbstoff in vitale Zellen nicht eindringt.

Zur Bestimmung des Anteils apoptotischer Zellen nach Stimulation der mit IL-4R α , IL-4R α_{IT} oder dem leeren Vektor transfizierten Zellklone mit IL-4 wurden 1×10^6 Zellen/well in 1 ml Medium in 24-well-Platten je unter Zusatz von 4 ng/ml hIL-4 oder mL-4 bzw. ohne Interleukin für 42 h bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden die Zellen gewaschen, je $1,5 \times 10^5$ Zellen in 100 μ l Calcium-Puffer resuspendiert und nach Zugabe von Annexin V-FITC (Bender MedSystems) für 20 min im Dunkeln auf Eis inkubiert. Die Zellen wurden nochmals gewaschen, Propidiumjodid hinzugefügt und sofort im Durchflußzytometer gemessen.

3.11 RNase-Protection-Assay

Der RNase-Protection-Assay (RPA) basiert auf dem Prinzip, daß einzelsträngige RNA von RNasen verdaut wird, während doppelsträngige RNA-RNA-Hybride vor dem Verdau durch bestimmte RNasen geschützt sind. Durch Hybridisierung der RNA mit RNA-Sonden, die Sequenzen enthalten, die zu der nachzuweisenden RNA komplementär sind, wird bei dem nachfolgenden RNase-Verdau der hybridisierte Bereich der Sonden vor dem Angriff der RNasen bewahrt, und kann anschließend gelelektrophoretisch aufgetrennt und detektiert werden. Da die Sonden auch Sequenzen enthalten, die zu der nachzuweisenden RNA nicht komplementär sind und daher während der RNase-Behandlung verdaut werden, sind die unverdaute Sonde und der beim RNase-Verdau „geschützte“ Bereich in ihrer Länge voneinander zu unterscheiden. Unter Einsatz Fluorescein-markierter RNA-Sonden wurde ein nicht radioaktiver RPA etabliert, bei dem ohne weitere Hybridisierungsschritte nach Gelelektrophorese die Sonden direkt detektiert werden konnten (Abb. 8 und Abb. 9).

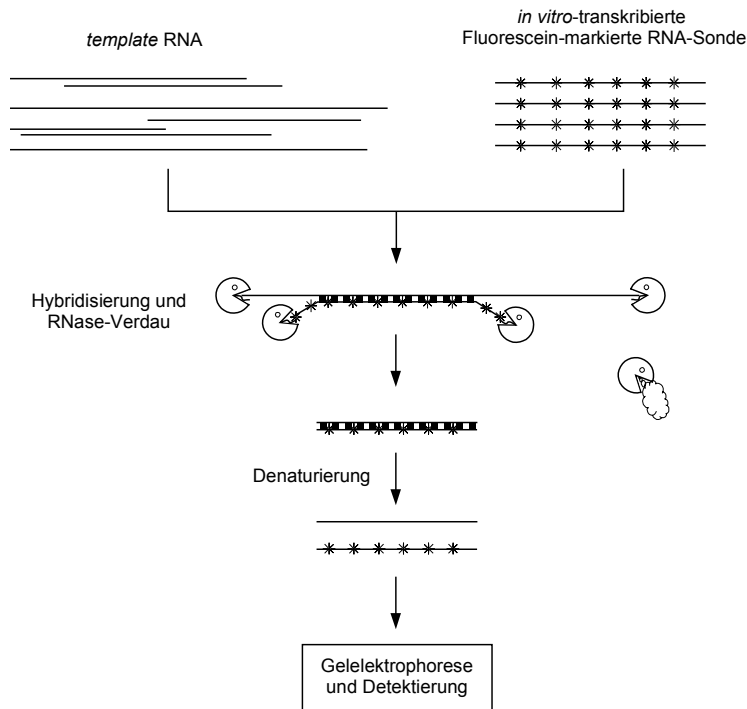


Abb. 8 Prinzip des RNase-Protection-Assays (Erläuterung siehe Text)

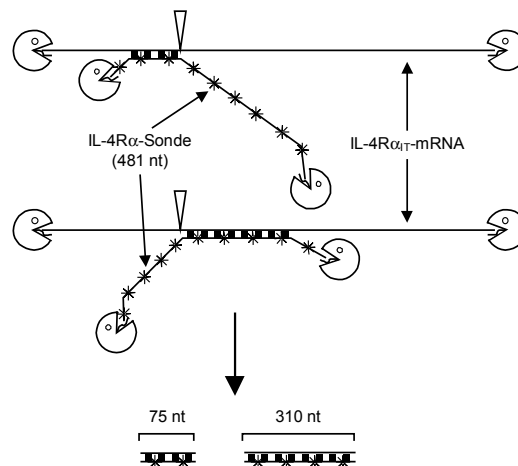


Abb. 9 Entstehung der beiden Fragmente von 310 und 75 nt bei RNase-Protektion der Sonde durch IL-4R α IT-mRNA. Der Bereich der Sonde, der der Sequenz des „Exon x“ komplementär ist, bindet nicht an die IL-4R α IT-mRNA und wird daher von der RNase verdaut (siehe auch Abb. 10)

3.11.1 In vitro-Transkription der Fluorescein-markierten RNA-Sonde

Die im RPA eingesetzte Sonde ist einem Bereich der IL-4R-mRNA komplementär, der das alternativ gespleißte Exon enthält. Damit ist mit derselben Sonde ein Nachweis und die Unterscheidung der IL-4R- und der IL4R α IT-mRNA möglich. Zur Herstellung der Sonde wurde ausgehend von dem Plasmid pCR3.1TM-Uni-IL-4R als *template* das geeignete Fragment mit dem Primerpaar IL4R 950 up/IL4R 1384 down amplifiziert. Um eine gerichtete Ligation in

den Vektor pCR3.1TM-Uni zu ermöglichen, wurde der Primer *IL-4R 1384 down* zuvor phosphoryliert.

Reaktionsansatz

1 µl	pCR3.1 TM -Uni-IL-4R (Plasmidpräparation 1:100 verdünnt)
3 µl	PCR-Buffer (10x konz.), PERKIN ELMER
0,1 µl	AmpliTa [®] DNA-Polymerase (5 U/µl), PERKIN ELMER
3 µl	dNTP-Mix (je 2 mM), GIBCO, BRL
1 µl	je Primer <i>IL-4R 950 up/IL-4R 1384 down</i> (phosph.) (10 µM), TIB MOLBIOL
<hr/>	
	H ₂ O ad 30 µl

Reaktionsbedingungen

initiale Denaturierung: 94°C 5 min	
Annealing: 60°C 45 sec	30 Zyklen
Elongation: 72°C 60 sec	
Denaturierung: 94°C 60 sec	

abschließende Elongation: 72°C 10 min

Dieses Fragment wurde in den Vektor pCR3.1TM-Uni so gerichtet einkloniert, daß bei vom T7-Promoter des Vektors ausgehender Transkription eine zur IL-4R α -mRNA komplementäre Sequenz entsteht. Anschließend wurde der Vektor mit der Restriktionsendonuklease EcoRI linearisiert und nach Phenol/Chloroform-Extraktion und Ethanol-Fällung in die *in-vitro*-Transkription eingesetzt.

In der *in-vitro*-Transkription wird das in den Reaktionsansatz gegebene Fluorescein-12-dUTP von der RNA-Polymerase in das Transkript eingebaut.

Reaktionsansatz *in-vitro*-Transkription

ca. 1 µg	linearisierte Plasmid-DNA
2 µl	Fluorescein RNA Labeling Mix (je 10 mM ATP, GTP und CTP, 6,5 mM UTP, 3,5 mM Fluorescein-12-UTP), Boehringer-Mannheim
2 µl	10x Transkriptionspuffer, Boehringer-Mannheim
2 µl	T7 RNA-Polymerase (10 U/µl), Boehringer-Mannheim
<hr/>	
	H ₂ O ad 30 µl

Der Ansatz wurde für 2 h bei 37°C inkubiert.

Zur Entfernung der *template*-DNA wurde der Ansatz nach Zugabe von 2 µl DNase I, RNase-frei (10 U/µl) (Boehringer-Mannheim) für weitere 15 min bei 37°C inkubiert und anschließend die Reaktion mit 2 µl 0,2 M EDTA, pH 8,0 auf Eis gestoppt.

Die nicht eingebauten Nukleotide wurden durch Zentrifugation über eine Sephadex G50-Säule (Pharmacia Biotech) abgetrennt und das aufgereinigte Transkript 1:100 in RPA-Hybridisierungspuffer (PharMingen) verdünnt.

3.11.2 RNase Protection

Ca. 70 µg RNA wurden in einer Vakuum-Zentrifuge getrocknet, in 9 µl RPA-Hybridisierungspuffer gelöst und zusammen mit 1 µl der verdünnten Fluorescein-markierten IL-4R-Sonde nach kurzer Denaturierung bei 90°C für 12-16 h bei 50°C inkubiert.

Je Probe wurden 100 µl RNase-Reaktionsgemisch (RNase-Puffer, 125 U RNase T1 und 8 ng RNase A) dazugegeben und bei 30°C für 45 min inkubiert. Mit einem anschließenden Verdau der RNase mit Proteinase K (12 µg in 18 µl Proteinase K-Puffer) für 15 min bei 37°C wurde die Reaktion gestoppt.

Nach Fällung der Proben in Ethanol wurden die Pellets in Formamid-Ladepuffer gelöst, nach kurzer Denaturierung auf Eis gestellt und anschließend zur Analyse auf ein denaturierendes 6%iges Polyacrylamid-Gel (7,5 ml Acrylamid/Bisacrylamid (19:1, 40%), 5 ml 10x TBE, 24 g Harnstoff, H₂O ad 50 ml, 300 µl Ammoniumpersulfat (10%), 40 µl TEMED) aufgetragen.

Als Größenmarker wurden die unverdaute IL-4R α -Sonde von 481 nt und ein weiteres *in vitro*-Transkript von 193 nt, hergestellt nach Linearisierung des pCR3.1/IL-4R α -Vektors mit Ball, eingesetzt (Abb. 10).

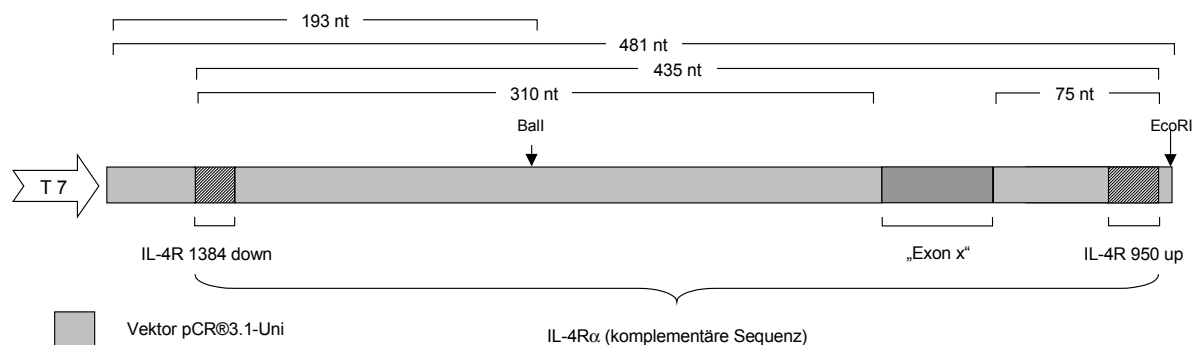


Abb. 10 Schematische Darstellung der RPA-Sonde. Nach Schneiden des Vektors mit EcoRI kann ein Fragment von 481 nt *in vitro*-transkribiert werden. Das durch die IL-4R α -mRNA geschützte Fragment hat nach Hybridisierung und RNase-Verdau eine Länge von 435 nt, von der IL-4R α _{IT}-mRNA werden zwei Fragmente von 310 und 75 nt Länge geschützt (siehe auch Abb. 9). Wird der Vektor mit der Restriktionsendonuklease Ball geschnitten, entsteht nach *in vitro*-Transkription ein Fragment von 193 nt. Dieses und das 481 nt lange Fragment wurden als Größenmarker eingesetzt.

3.11.3 Gene Scan

Die Proben wurden in der Gelelektrophorese-Kammer eines ABI PrismTM 373 Automatic Sequencer (PE, Applied Biosystems, Weiterstadt) aufgetrennt und mit der GeneScan Analysis-Software Version 1.2.2-1 (PE, Applied Biosystems) ausgewertet.

4 ERGEBNISSE

4.1 Identifizierung der IL-4R α _{IT} mRNA

Bei der Untersuchung der Expression der mRNA des Interleukin-4 Rezeptors mit RT-PCR an Knochenmark und Blut von Patienten mit akuter lymphoblastischer Leukämie ließ sich bei elektrophoretischer Auftrennung der Produkte im Agarosegel zusätzlich zu dem erwarteten Produkt von 502 bp in wechselnder Intensität eine weitere kürzere Bande nachweisen (Abb. 11). Durch direkte Sequenzierung der Amplifikate beider Banden ließ sich zeigen, daß dem kürzeren Fragment bei ansonsten identischer Sequenz ein Stück von 50 Basenpaaren (bp) fehlte (Abb. 12 und Abb. 13). Diese Beobachtung legte nahe, daß es sich dabei um das Amplifikat eines alternativ gespleißten Transkriptes mit Fehlen eines einzelnen oder mehrerer Exons handelt.

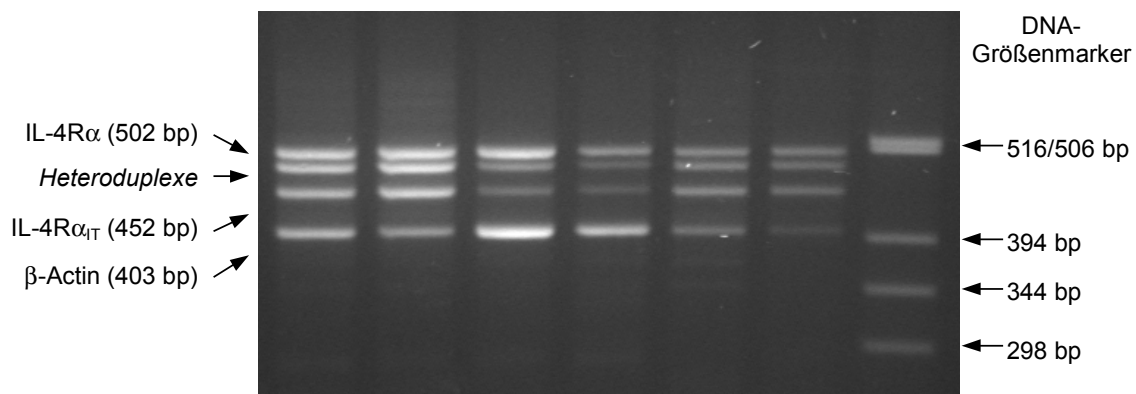


Abb. 11 RT-PCR zur Amplifizierung von IL-4R α -cDNA. Dargestellt sind 6 Proben (PB oder KM) von Patienten mit ALL, bei denen sich zusätzlich zu der erwarteten Bande ein weiteres, 50 bp kürzeres Produkt in sehr unterschiedlicher Intensität nachweisen läßt. Auf die Entstehung der als *Heteroduplexe* bezeichneten Bande wird weiter unten eingegangen.

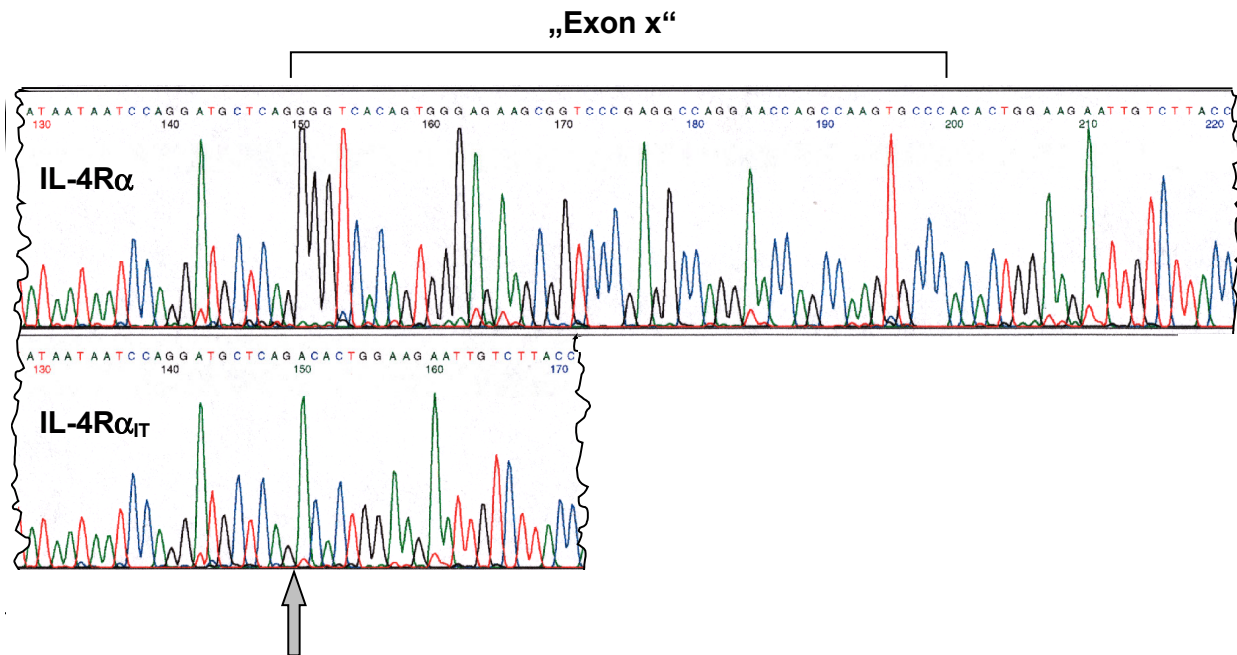


Abb. 12 Elektropherogramm der Sequenzierungen der PCR-Fragmente von IL-4R α und IL-4R α_{IT} . Der Pfeil bezeichnet in der Splice-Variante IL-4R α_{IT} die Stelle, an welcher im Vergleich zur vollständigen IL-4R α -cDNA 50 bp fehlen.

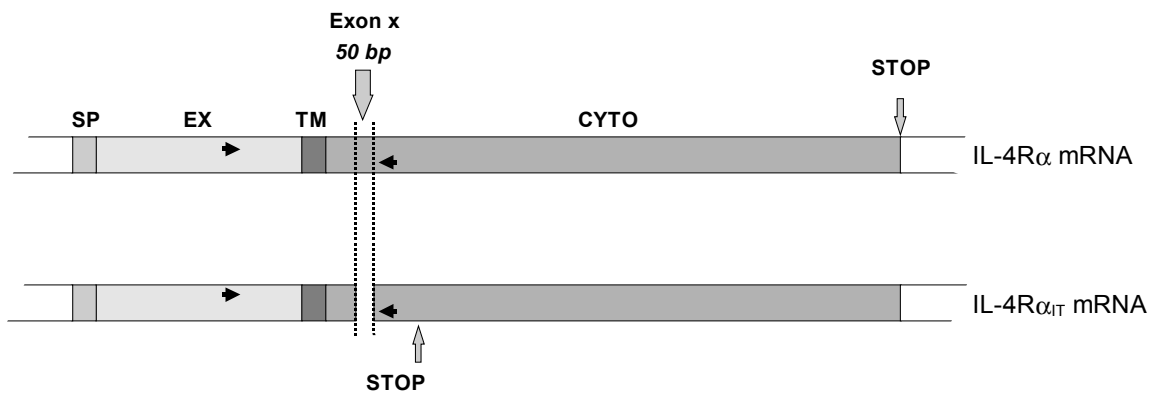


Abb. 13 mRNA-Struktur von IL-4R α and IL-4R α_{IT} : Durch Auslassen des Exon x kommt es zur Verschiebung des Leserasters und zur Entstehung eines *in frame*-Stop Codons. Die schwarzen Pfeile bezeichnen die IL-4R α -spezifischen Primer *IL-4R 617 up/IL-4R 1118 down* (**Tab. 1**); SP: Signalpeptid; EX: extrazelluläre Domäne; TM: transmembranöse Domäne; CYTO: zytoplasmatische Domäne; STOP: Stop-Codon.

Um das zu belegen, war es nötig, die Exon-Grenzen dieses Bereiches zu identifizieren. Eine ausführliche Recherche der Literatur und der veröffentlichten Sequenzen in den Gen-Datenbanken erbrachte keine weiterführenden Informationen über die genomische Struktur der humanen IL-4R α -DNA. Für die eng verwandte mRNA des IL-4R α der Maus [125] sind diese Daten jedoch bereits veröffentlicht. Ein Sequenzvergleich von humaner und muriner IL-4R α -mRNA zeigte, daß die fehlenden Nukleotide der beobachteten IL-4R α -mRNA-

Variante mit einer Homologie von 74% mit dem Exon 11 der IL-4R α -mRNA der Maus übereinstimmte, und ließ vermuten, daß es sich bei diesem Segment ebenfalls um ein Exon handelt (Abb. 14). Um dies zu belegen, wurden mit einer Exon-übergreifenden PCR die diesem Segment benachbarten Bereiche der genomischen DNA amplifiziert, wobei jeweils ein Primer *upstream* bzw. *downstream* der beiden vermuteten Exon-Grenzen positioniert war (Abb. 15).

murine IL4R α Exon 11 gtgcccctctctgggataagcagacccgaagccaggagtcaaccaagtacc
human IL4R α Exon x gggtcacagtgggagaagcgggtcccagggccaggaaccagccaagtgcc

Abb. 14 Sequenzvergleich des alternativ gespleißten Exon x der humanen IL-4R α -mRNA mit dem korrespondierenden Exon 11 der Maus (Homologie 74%).

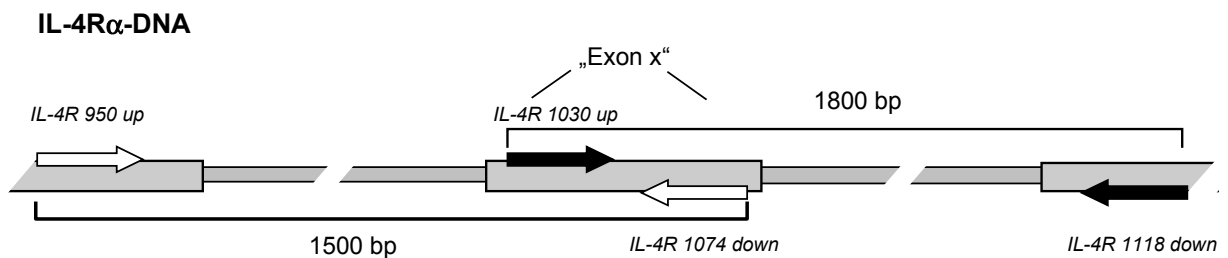


Abb. 15 Lokalisation der Primerpaare IL-4R 950 up/IL-4R 1074 down und IL-4R 1030 up/IL-4R 1118 down zur Amplifizierung der an das „Exon x“ angrenzenden Introns der IL-4R α -DNA.

Dies resultierte in Produkten von ca. 1500 bp für das Fragment *upstream* und ca. 1800 bp für das Fragment *downstream* dieses Segmentes. Durch die Sequenzierung der 3'- und 5' Enden dieser Produkte konnte das 50 bp-Fragment als vollständiges Exon identifiziert werden, da ihm auf genomischer Ebene tatsächlich Sequenzen benachbart sind, die den benachbarten Introns entsprechen und von den Konsensus-Sequenzen der *donor* und *acceptor splice sites* flankiert werden (Abb. 16). Dies zeigte, daß die kürzere Variante einem alternativ gespleißten Transkript entspricht, dem ein vollständiges Exon von 50 nt Länge fehlt.

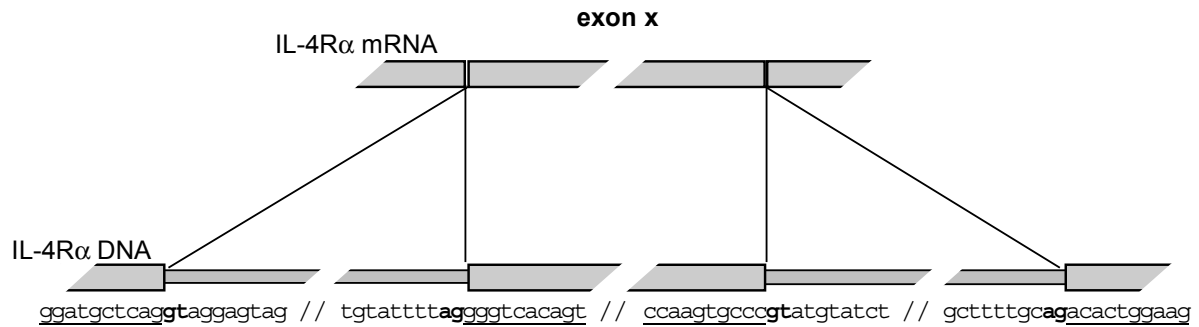
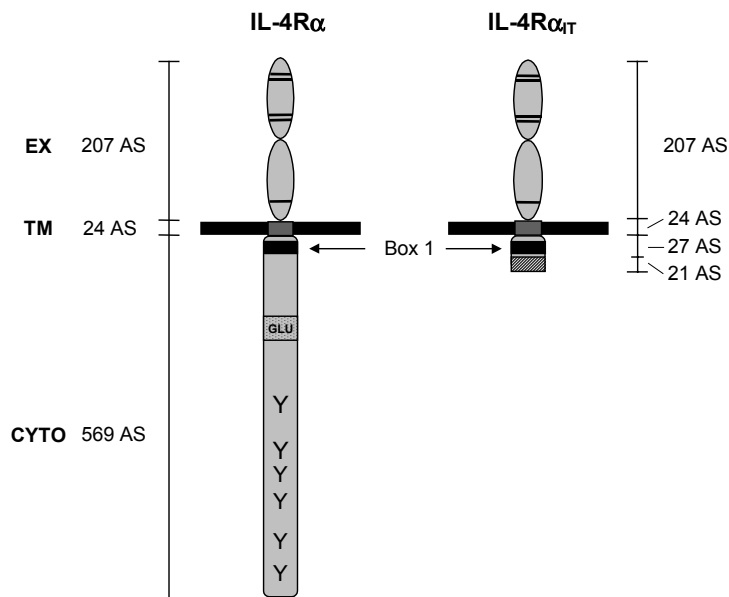


Abb. 16 Region des alternativ gespleißten Exon x der IL-4R α -mRNA (oben) und den angrenzenden Introns der genomischen DNA (unten). Die DNA-Sequenz der Exon-Intron-Grenzen ist unten aufgeführt. Exon-Sequenzen sind unterstrichen, die *donor* und *acceptor splice sites* sind fett gedruckt.

Dieses Exon, das im Folgenden als „Exon x“ bezeichnet wird, ist 82 nt *downstream* des Bereiches gelegen, der für die transmembranöse Domäne des IL-4R α kodiert (Abb. 13). Bei Translation dieser Variante käme es durch Verschiebung des Leserasters zu der Entstehung von 21 neuen Aminosäuren, gefolgt von einem Stop-Codon. Ein entstehendes Protein hätte daher eine stark verkürzte zytoplasmatische Domäne und besäße nur einen Teil der für die Signaltransduktion essentiellen Bereiche (Abb. 17). Gale *et al.* [112] hat eine Splice-Variante der gemeinsamen beta-Kette (*common beta chain*, β_C) der Rezeptoren für GM-CSF, IL-3 und IL-5 beschrieben, deren mRNA einen sehr ähnlichen Aufbau wie die Splice-Variante des IL-4R hat. Diese Rezeptor-Variante kodiert ebenfalls für einen Rezeptor mit stark verkürzter intrazellulärer Domäne und erhielt daher den Namen β_{IT} (IT für *intracytoplasmic truncated*). In Anlehnung daran wurde die in dieser Arbeit identifizierte Splice-Variante der IL-4R α -Kette IL-4R α_{IT} genannt.

A**B**

↓

IL-4R α ...KIKKEWWDQIPNPARSRLVAIIIQDAQ GSQWEKRSRGQEPAKCPHWKNCLT...

IL-4R α_{IT} ...KIKKEWWDQIPNPARSRLVAIIIQDAQ TLEELSYQALALFSGAQHEKG

Abb. 17 **A:** Potentielle Proteinstruktur von IL-4R α_{IT} (rechts) im Vergleich zum vollständigen IL-4R α (links). Die schwarze Box stellt die Homologie-Box 1 dar, die in IL-4R α_{IT} erhalten ist, die schraffierte Box entspricht dem durch die Verschiebung des Leserasters veränderten C-terminalen Ende von 21 Aminosäuren. EX: extrazelluläre; TM: transmembranöse; CYTO: cytoplasmatische Domäne. GLU: Glutaminsäurereiche Region. Die Abbildung zeigt, daß alle Tyrosinreste und die für die Proliferation essentielle glutaminreiche Region in IL-4R α_{IT} fehlen. **B:** Potentielle Aminosäuresequenzen von IL-4R α_{IT} und IL-4R α . Der Pfeil bezeichnet den Beginn der durch die Verschiebung des Leserasters geänderten Sequenz.

Bei weiter gelelektrophoretischer Auftrennung der Banden der PCR-Produkte von IL-4R α und IL-4R α_{IT} war regelmäßig zwischen den beiden Banden eine zusätzliche Bande abzugenzeln (Abb. 11). Diese entsteht durch die Bildung von Heteroduplexen aus den Einzelsträngen der Amplifikate von IL-4R α und IL-4R α_{IT} . Ein Nachweis dessen gelang durch die Analyse der Amplifikate der Banden in einer SSCP (Abb. 18).

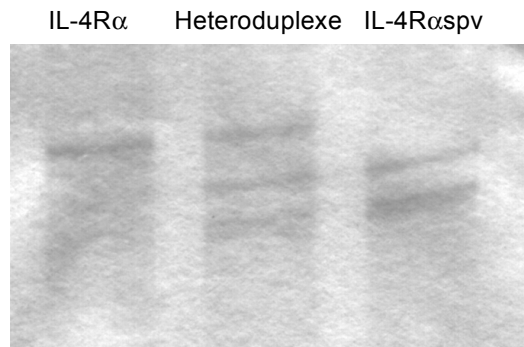


Abb. 18 SSCP-Analyse der PCR-Produkte von IL-4R α und IL-4R α_{IT} zum Nachweis der Heteroduplex-Bande. Da die Heteroduplexe aus Einzelsträngen von IL-4R α und IL-4R α_{IT} bestehen, zeigt sich auch ein Bandenmuster, das sich aus den Banden von IL-4R α und IL-4R α_{IT} zusammensetzt.

4.2 Untersuchung der Expression der IL-4R α_{IT} mRNA an Patientenmaterial

Die IL-4R α_{IT} mRNA kodiert für ein Protein, dem bestimmte zytoplasmatische Domänen fehlen, denen wichtige Funktionen in der Signaltransduktion zukommen. Die Überlegung, daß ein aus dieser mRNA eventuell entstehendes Rezeptorprotein eine veränderte biologische Funktion haben könnte, und die Beobachtung, daß die mRNA dieser Variante bei verschiedenen untersuchten Proben sehr unterschiedlich stark exprimiert zu werden schien, ließ es sinnvoll erscheinen, eine größere Gruppe von pädiatrischen Patienten mit ALL/AHL und außerdem Zellen unterschiedlicher hämatopoietischer Zelllinien auf die Expression der IL-4R α_{IT} -mRNA im Verhältnis zum IL-4R α zu untersuchen. Als dafür geeignete Methode wurde eine RT-PCR gewählt, die durch den Einsatz der in der Abb. 13 dargestellten Primer, die den alternativ gespleißten Bereich flankieren, eine simultane Amplifikation beider Produkte im Sinne einer kompetitiven PCR ermöglicht. Außerdem wurde als interne Kontrolle die konstitutiv exprimierte mRNA des β -Actin im selben Ansatz mitamplifiziert.

Nach Agarosegel-Elektrophorese wurden die Amplifikate mit Hilfe eines Gel-Dokumentationssystems quantitativ ausgewertet, und als Maß für die Expression der Splice-Variante im Verhältnis zum IL-4R α wurde eine standardisierte AUC (*area under the curve*, Fläche unter der Kurve) der IL-4R α_{IT} mRNA (sAUC(IL-4R α_{IT})) errechnet (Abb. 19). Die sAUC(IL-4R α_{IT}) gibt den prozentualen Anteil der Expression der IL-4R α_{IT} -mRNA an der Gesamt-Expression von IL-4R α - und IL-4R α_{IT} -mRNA wieder.

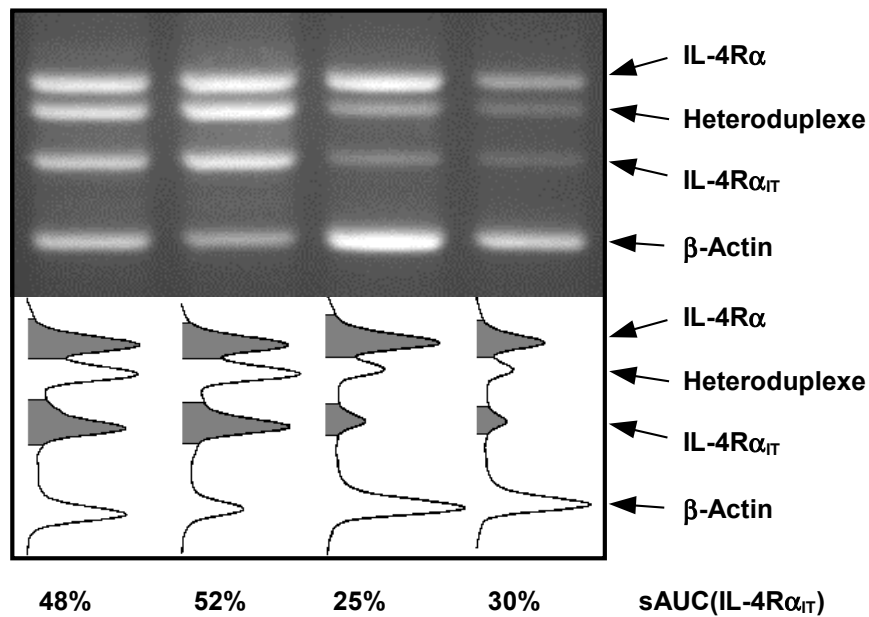


Abb. 19 Profilanalyse zur Quantifizierung der Banden bei vier verschiedenen Patientenproben. Die grau getönten Flächen entsprechen den AUC's für IL-4Rα und IL-4Rα_{IT}. Die Werte für die sAUC(IL-4Rα_{IT}) machen die sehr unterschiedliche Expression der Splice-Variante bei verschiedenen Patientenproben deutlich. Bei der zusätzlichen Bande zwischen den Banden von IL-4Rα und IL-4Rα_{IT} handelt es sich um Heteroduplexe, die aufgrund der Ähnlichkeit der Amplifikate von IL-4Rα und seiner Splice-Variante entstehen. Dies wurde durch eine SSCP(single stranded conformational polymorphism)-Analyse (siehe auch **Abb. 18** und Abschnitt 4.1) nachgewiesen.

Hierbei fiel auf, daß die sAUC(IL-4Rα_{IT}) mit Werten von 0-80% interindividuell sehr variierte, während sie bei unterschiedlichen Proben desselben Patienten aber annähernd konstant zu sein schien. Dies wurde auch bei der statistischen Auswertung deutlich: Beim Vergleich von KM mit Blut zum Zeitpunkt der Diagnose und von KM zum Zeitpunkt der Diagnose mit KM in Remission jeweils derselben Patienten zeigte sich kein statistisch signifikanter Unterschied zwischen den verglichenen Proben (**Abb. 20**). Auch im Hinblick auf den Immunphänotyp der Blasten war kein Zusammenhang mit der Expression der Splice-Variante erkennbar (Daten nicht dargestellt). Die sAUC(IL-4Rα_{IT}) in den hämatopoetischen Zelllinien Jurkat, MOLT4, Raji, KM-H2, 697 und REH betrug weniger als 10%.

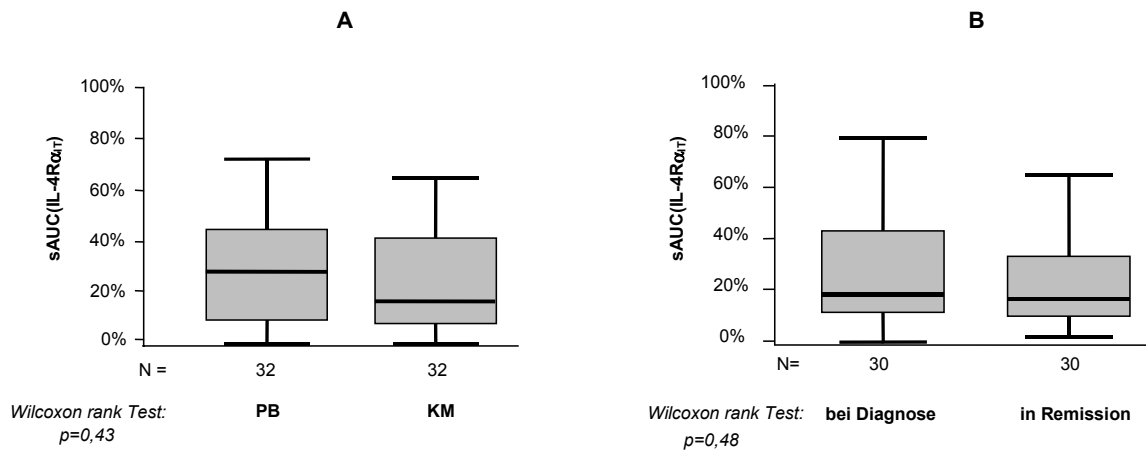


Abb. 20 Boxplots zum Vergleich unterschiedlicher Untersuchungsmaterialien jeweils derselben Patienten: Sowohl beim Vergleich von Blut mit KM zum Zeitpunkt der Diagnose (A) als auch von KM bei Diagnose mit Remissionsmark (B) zeigt die statistische Auswertung keinen signifikanten Unterschied.

Einen hoch signifikanten Unterschied zeigte jedoch der Vergleich von Patienten mit ALL-Ersterkrankung mit Patienten im ersten oder folgenden Rezidiv. In diese Auswertung wurden nur KM-Proben zum Zeitpunkt der Diagnose einbezogen (Abb. 21). Der Median für die Expression der Splice-Variante im Verhältnis zum IL-4R α war bei den untersuchten Patienten mit Ersterkrankung mit einem Wert von 10,25% (*range* 0-60%) für die sAUC(IL-4R α_{IT}) weitaus geringer als bei den Rezidivpatienten (Median: 39,5%, *range* 0-80%).

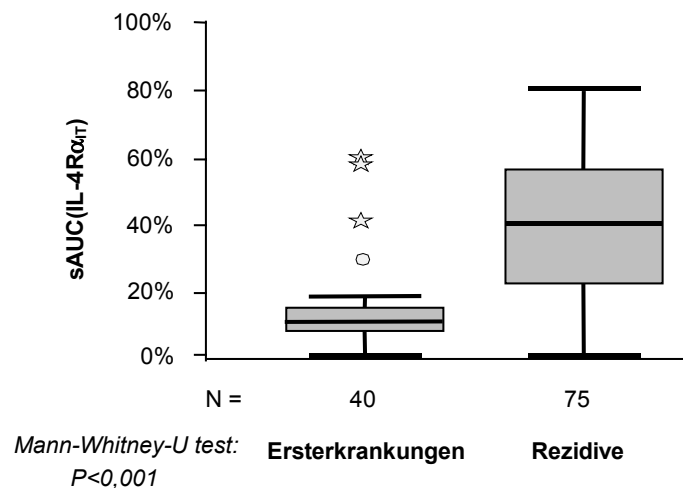


Abb. 21 Vergleich der Expression von IL-4R α_{IT} , ausgedrückt als sAUC(IL-4R α_{IT}), in Proben von Patienten mit Ersterkrankung mit einer Gruppe von Rezidivpatienten, dargestellt in Boxplots.

Im weiteren Verlauf der Arbeit mußte die Deutung dieses Ergebnisses wieder revidiert werden, da sich zeigte, daß der Unterschied der Werte für die sAUC(IL-4R α_{IT}) zwischen

diesen beiden Gruppen keinen Zusammenhang mit der Erkrankung an einer ersten oder rezidierten Leukämie darstellt, sondern die im Folgenden erläuterten Gründe hat.

So betrug die $sAUC(IL-4R\alpha_{IT})$ bei der Untersuchung von Blut einiger gesunder erwachsener Probanden ausnahmslos weniger als 20%. Dieses Untersuchungsmaterial stammte vorwiegend von Mitarbeitern unseres Labores und wurde direkt nach Abnahme aufgearbeitet. Um die Gruppe gesunder Kontrollpersonen zu vergrößern, wurde weiteren Probanden Blut abgenommen, das aber transportbedingt oft nicht am selben Tag weiterverarbeitet werden konnte. Bei diesem Material fiel eine um so stärkere Expression der Splice-Variante in Relation zur $IL-4R\alpha$ mRNA auf, je länger der Zeitraum zwischen Abnahme und Aufarbeitung war. Diese Beobachtung wurde wiederholt experimentell bestätigt. Peripheres Blut gesunder Probanden wurde dazu in mehrere Portionen geteilt und zum Teil sofort nach Abnahme, zum Teil bis zu vier Tage später aufgearbeitet (Abb. 22). Hierbei spielte es keine Rolle, ob die Proben als Vollblut oder nach Isolierung der mononukleären Zellen in eigenem Plasma oder Zellmedium aufgehoben wurden. Bei Aufbewahrung der Zellen im Kühlschrank war der Effekt weniger stark ausgeprägt als bei Zimmertemperatur (Abb. 23).

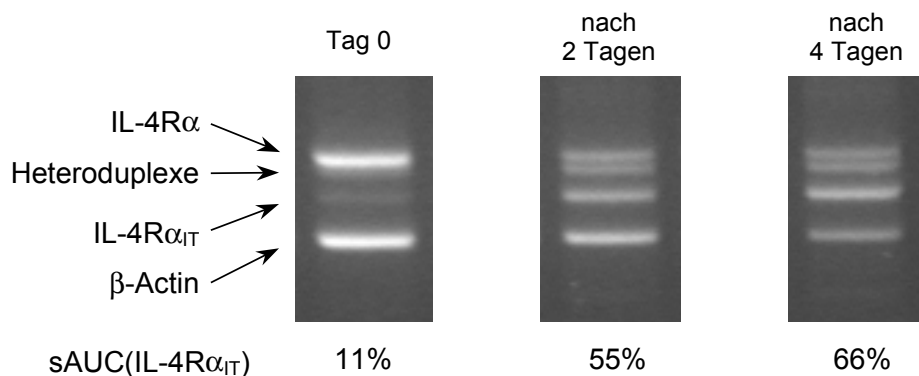


Abb. 22 Expression von $IL-4R\alpha_{IT}$ mRNA im Verhältnis zu $IL-4R\alpha$ bei Aufarbeitung von mononukleären Zellen derselben Blutprobe direkt nach Abnahme oder 2 bzw. 4 Tage später: Der Anteil der Expression von $IL-4R\alpha_{IT}$ ist umso größer, je länger der Zeitraum zwischen Abnahme und Aufarbeitung der Proben war.

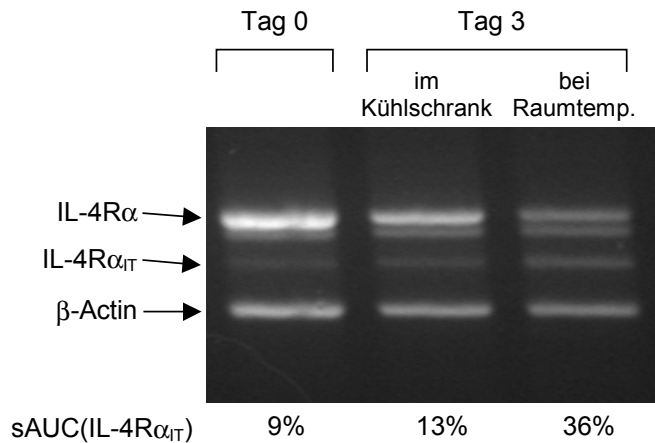


Abb. 23 Einfluß der Temperatur auf die Expression von IL-4Rα_{IT} bei verzögerter Aufarbeitung. Bei Kühlung der Proben ist der Effekt der Zunahme der sAUC(IL-4Rα_{IT}) weniger ausgeprägt.

Vor dem Hintergrund dieser Beobachtungen wurde die Expression der Splice-Variante im Verhältnis zum IL-4Rα im untersuchten Patientenmaterial in Bezug auf die transportbedingte Zeit zwischen Abnahme und Aufarbeitung des Untersuchungsmaterials statistisch neu ausgewertet. Das Ergebnis ist in der Abb. 24 dargestellt. Ausgewertet wurden diesmal alle untersuchten Proben von Rezidivpatienten und Patienten mit Ersterkrankung unabhängig von der Art des Materials oder dem Immunphänotyp der Erkrankung (n=197) (Abb. 24A). Bei Untersuchungsmaterialien, die am selben Tag abgenommen wie aufgearbeitet wurden, zeigte die sAUC(IL-4Rα_{IT}) signifikant geringere Werte (Median 10%, *range* 0-80%, n=79) als bei den Proben die einen Tag (Median 32,5%, *range* 0-65% n=79) oder 2-7 Tage (Median 51%, *range* 0-72%, n=39) unterwegs waren (p=<0,01, Kruskal-Wallis Test) (Abb. 24A). Auch bei Betrachtung ausschließlich der Rezidivpatienten gab es keine entscheidende Änderung dieses Ergebnisses (Tag 0: Median 14,5%, *range* 0-56%, n=15; 1. Tag: Median 33%, *range* 0-65%, n=71; 2.-7. Tag: Median 53,75, *range* 0-72,5%, n=34; p<0,01, Kruskal-Wallis Test) (Abb. 24B). Bei der Auswertung ausschließlich der Patienten mit Ersterkrankung war aufgrund der kleinen Patientengruppe eine weitere Aufspaltung der Materialien, die einen Tag und länger unterwegs waren, nicht sinnvoll. Auch hier war der Unterschied zwischen den Gruppen, wenn auch etwas weniger ausgeprägt, signifikant (Tag 0: Median 10%, *range* 0-58%, n=64; 1.-2. Tag: Median 20%, *range* 0-60%, n=13, p=0,016, Mann-Whitney-U Test) (Abb. 24C).

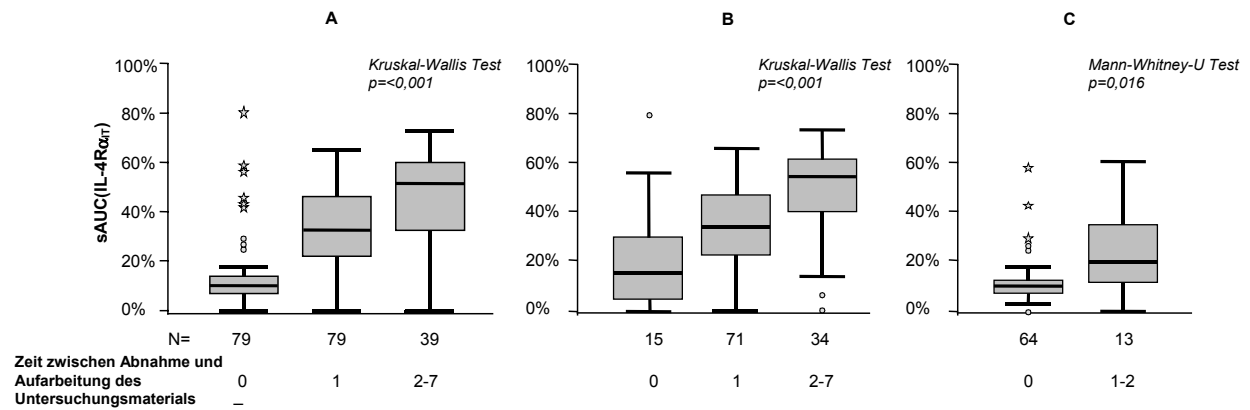


Abb. 24 Vergleich unterschiedlich langer Transportzeiten des Untersuchungsmaterials. Deutlicher Anstieg der Expression der IL-4R α_{IT} bei längeren Transportzeiten. In A stammt das untersuchte Material (Blut oder KM) von Patienten mit Ersterkrankungen oder Rezidiven, in B wurden nur Rezidivpatienten, in C nur Patienten mit Ersterkrankung eine ALL ausgewertet.

4.3 Untersuchung der mRNA-Stabilität von IL-4R α und IL-4R α_{IT}

Ein möglicher Grund für das beobachtete Phänomen wäre ein auf ungleichen Stabilitäten beruhender unterschiedlicher Abbau der beiden mRNAs. Die Stabilität einer mRNA kann bestimmt werden, indem mit einem geeigneten Transkriptionshemmer die Transkription und damit der Nachschub neuer mRNA über einen bestimmten Zeitraum blockiert werden und anschließend die Veränderung der mRNA-Menge quantifiziert wird.

Für diesen Zweck wurde die RNA mononukleärer Zellen eines gesunden Probanden teils am Tag der Blutabnahme, teils 2 und 4 Tage später aufgearbeitet. Die Zellen wurden bis zur Aufarbeitung in Zellmedium mit bzw. ohne Zugabe von Actinomycin D bei Zimmertemperatur aufgehoben. Anschließend wurden diese Proben auf die Expression von IL-4R α und IL-4R α_{IT} mRNA untersucht.

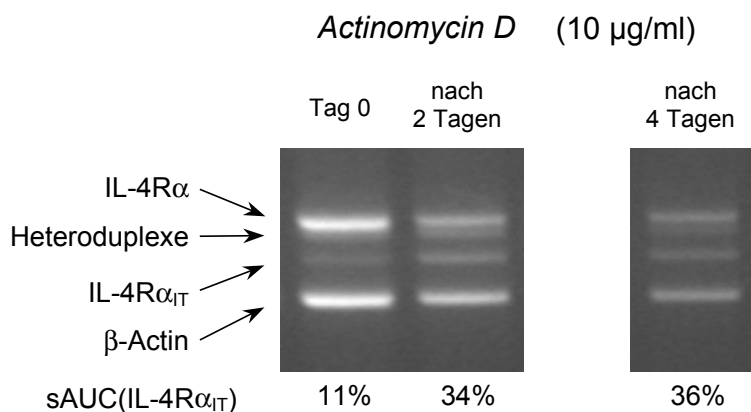


Abb. 25 Stabilität der mRNA von IL-4R α und IL-4R α_{IT} . Bei Hemmung der Transkription mit Actinomycin D zur Beurteilung der Degradierung der beiden mRNA-Varianten zeigt sich bei verzögerter Aufarbeitung der Zellen ebenfalls eine Zunahme der sAUC(IL-4R α_{IT}).

Wie in Abb. 25 zu sehen, nimmt auch bei Hemmung der Transkription mit Actinomycin D die sAUC(IL-4R α_{IT}) bei den nach 2 und 4 Tagen aufgearbeiteten Proben zu (11% → 34% → 36%), was für eine größere Stabilität der mRNA von IL-4R α_{IT} spricht. Betrachtet man im Vergleich dazu allerdings die Proben, die ohne Zugabe von Actinomycin D 2 bzw. 4 Tage gestanden haben (Abb. 26) ist dieser Effekt hier viel stärker ausgeprägt (11% → 55% → 66%). Unabhängig vom Abbau der mRNA scheint also auch eine Änderung der Expression von IL-4R α_{IT} eine Rolle zu spielen.

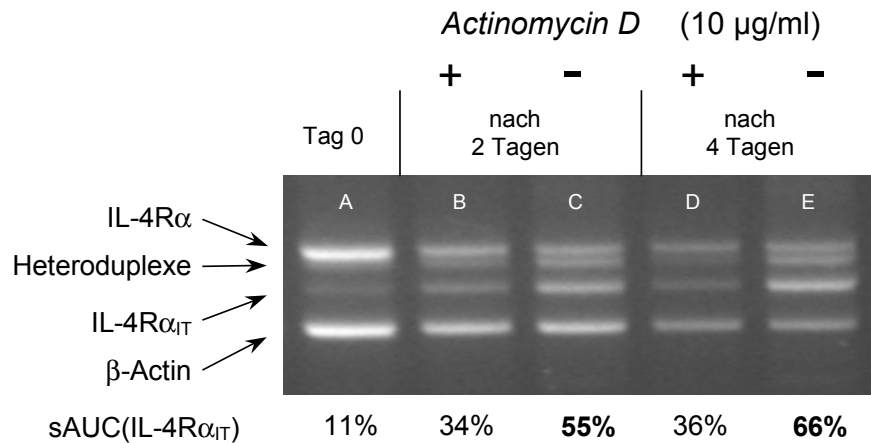


Abb. 26 Vergleich der Proben mit und ohne Hemmung der Transkription. Bei den Proben mit Actinomycin D zeigen sich nach verzögerter Aufarbeitung deutlich höhere Werte für die sAUC(IL-4R α_{IT}) (B+D) als bei den Proben ohne Transkriptionshemmung (C+E).

Dasselbe Phänomen, wenn auch in unterschiedlicher Ausprägung, war auch bei der Untersuchung einiger Splice-Varianten von anderen Zytokinen und Zytokin-Rezeptoren wie IL-7, IL-7R, IL-15, γ_C und β_C zu beobachten (Abb. 27). Sowohl die Zunahme des Verhältnisses der Transkripte zugunsten der Splice-Variante, wie auch die geringere Ausprägung dessen unter Hemmung der Transkription war regelmäßig zu beobachten.

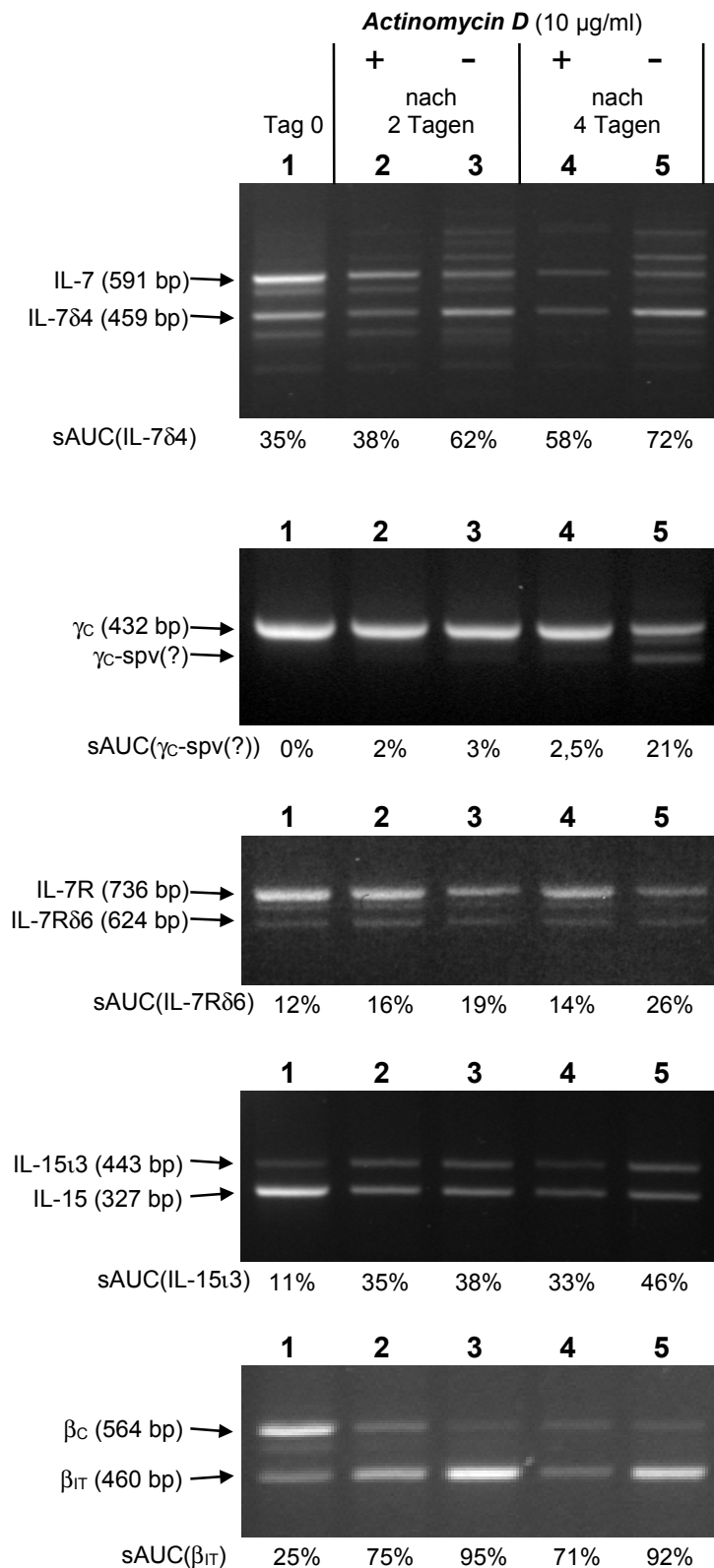


Abb. 27 Expression von Splice-Varianten anderer Interleukine oder Interleukin-Rezeptoren in mononukleären Zellen eines gesunden Probanden, die mit oder ohne Hemmung der Transkription entweder direkt oder erst 2 bzw 4 Tage nach Abnahme aufgearbeitet wurden. Die Zunahme der sAUC der Splice-Varianten ist sehr unterschiedlich ausgeprägt. Regelmäßig ist die Zunahme unter Actinomycin D geringer oder gar nicht nachweisbar. Die in der Probe „Tag 4 ohne Actinomycin D“ nachweisbare zusätzliche Bande der γ_C ist in der veröffentlichten Literatur bisher nicht beschrieben. Vermutlich handelt es sich hier ebenfalls um das Amplifikat eines alternativ gespleißten Transkriptes mit zusätzlicher typischer Heteroduplex-Bande.

4.4 Semiquantitative RT-PCR der mRNA von IL-4R α und IL-4R α_{IT}

Die Amplifizierung der beiden IL-4R α mRNA-Varianten mit der oben beschriebenen Methode der kompetitiven RT-PCR erlaubt ausschließlich Aussagen über das Verhältnis der beiden mRNAs zueinander, ausgedrückt als sAUC(IL-4R α_{IT}). Eine Aussage über die absolute Mengenänderung der Transkripte ist mit diesem Versuchsaufbau nicht möglich, so daß nicht zu ersehen ist, ob bei einem Anstieg der sAUC(IL-4R α_{IT}) bei verzögerter Aufarbeitung der Zellen die IL-4R α_{IT} -mRNA zunimmt, die IL-4R α -mRNA abnimmt oder ob beide Transkripte in unterschiedlichem Maße zu- bzw. abnehmen.

Um dies herauszufinden, wurden die einzelnen Transkripte mit jeweils spezifischen Primern in einer semiquantitativen RT-PCR amplifiziert (Abb. 28). Die mRNA der Glycerinaldehyd-Phosphat-Dehydrogenase (GAPDH), die als *housekeeping gene* konstitutiv exprimiert wird, diente als interner Standard. Um eine gegenseitige Beeinflussung der Amplifizierung der Produkte durch Konkurrenzreaktionen um Substrate wie Enzym oder Nukleotide zu vermeiden und um unterschiedliche cDNA-Verdünnungen bei der Amplifikation der jeweiligen *templates* zu ermöglichen (siehe Abschnitt 5.1.1), wurden IL-4R α bzw. IL-4R α_{IT} und GAPDH in jeweils unterschiedlichen Ansätzen amplifiziert.

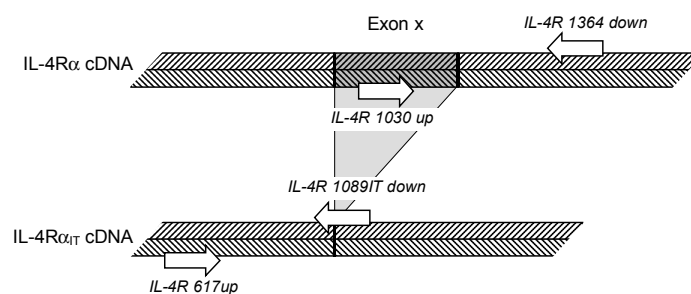


Abb. 28 Lokalisation der in der semiquantitativen RT-PCR eingesetzten, jeweils für IL-4R α und IL-4R α_{IT} spezifischen Primerpaare. IL-4R 1030 up sitzt im „Exon x“, das in IL-4R α_{IT} fehlt, und kann daher nur IL-4R α -cDNA amplifizieren, IL-4R 1089IT down überspannt die Grenze der beiden dem „Exon x“ benachbarten Exons und ist daher spezifisch für IL-4R α_{IT} -cDNA.

Die Banden dieses Versuches wurden über die Bestimmung ihrer optischen Dichte (*optical density*, O.D.) mit einem Gel-Dokumentationssystem und einer geeigneten Software quantifiziert. In Analogie zur Berechnung der sAUC(IL-4R α_{IT}) erfolgte die Bestimmung der relativen O.D. der Banden von IL-4R α bzw. IL-4R α_{IT} in Bezug auf GAPDH. Das Ergebnis ist in Abb. 29 graphisch dargestellt. Zum anschaulicheren Vergleich der Proben wurden die ermittelten Werte beider Transkripte am Tag 0 auf 100% gesetzt. Das Ergebnis der kompetitiven RT-PCR (Abb. 26) ließ sich hierbei gut nachvollziehen. In den Proben mit Actinomycin D nehmen wie erwartet beide Transkripte ab. In den Proben ohne Hemmung der Transkription wird nun deutlich, daß die Zunahme der sAUC(IL-4R α_{IT}) tatsächlich in einer

Hochregulation von IL-4R α_{IT} begründet ist, während die Expression von IL-4R α in diesen Proben abnimmt.

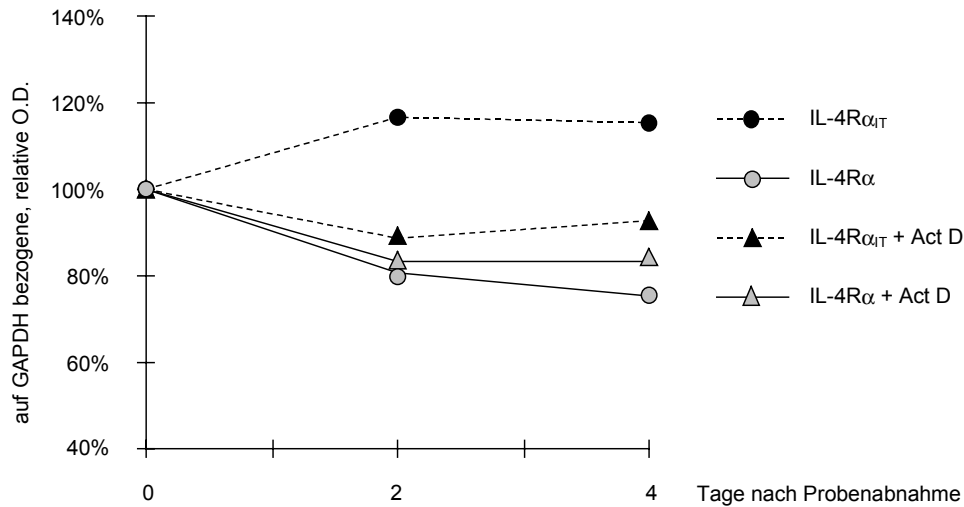


Abb. 29 Bestimmung der Expressionsunterschiede von IL-4R α und IL-4R α_{IT} bei verzögerter Aufarbeitung der Zellen mit und ohne Hemmung der Transkription. Dargestellt ist die Auswertung der semiquantitativen PCR mit jeweils für die beiden Transkripte spezifischen Primern zur Beurteilung der relativen Expressionsunterschiede von IL-4R α bzw. IL-4R α_{IT} zwischen den Proben. Während in den Proben mit Hemmung der Transkription beide Transkripte abnehmen, zeigt sich in den Proben ohne Actinomycin D eine Hochregulation von IL-4R α_{IT} . Die gemessenen O.D. der einzelnen Banden von IL-4R α bzw. IL-4R α_{IT} jeder Probe sind in Bezug zur O.D. der Bande für GAPDH derselben Probe gesetzt worden. Zum anschaulicheren Vergleich der Proben wurden die ermittelten Werte am Tag 0 auf 100% Prozent gesetzt.

4.5 Reversibilität der Zunahme der Expression von IL-4R α_{IT}

Nimmt man mononukleäre Zellen eines gesunden Probanden, die zwei Tage nach Entnahme der Probe bei Zimmertemperatur gestanden haben und daher die IL-4R α_{IT} mRNA recht stark exprimieren, wieder bei 37°C in Kultur, entweder in reinem Medium oder unter Stimulation mit Concanavalin A oder IL-4, zeigt sich bei der Durchführung einer kompetitiven RT-PCR, daß sich die sAUC(IL-4R α_{IT}) nach kurzer Zeit wieder drastisch verringert (Abb. 30A). Werden die beiden Transkripte wieder einzeln semiquantitativ amplifiziert, wird in der Probe, die in reinem Medium kultiviert wurde, eine Abnahme der Expression von IL-4R α_{IT} deutlich. In den Proben, die zusätzlich mit Concanavalin A oder IL-4 stimuliert wurden, wird im Vergleich zu der Probe ohne zusätzliche Stimulation die Expression beider Transkripte hochreguliert. Dennoch kommt es auch hier zu einer Abnahme der Expression der IL-4R α_{IT} mRNA (Abb. 30B).

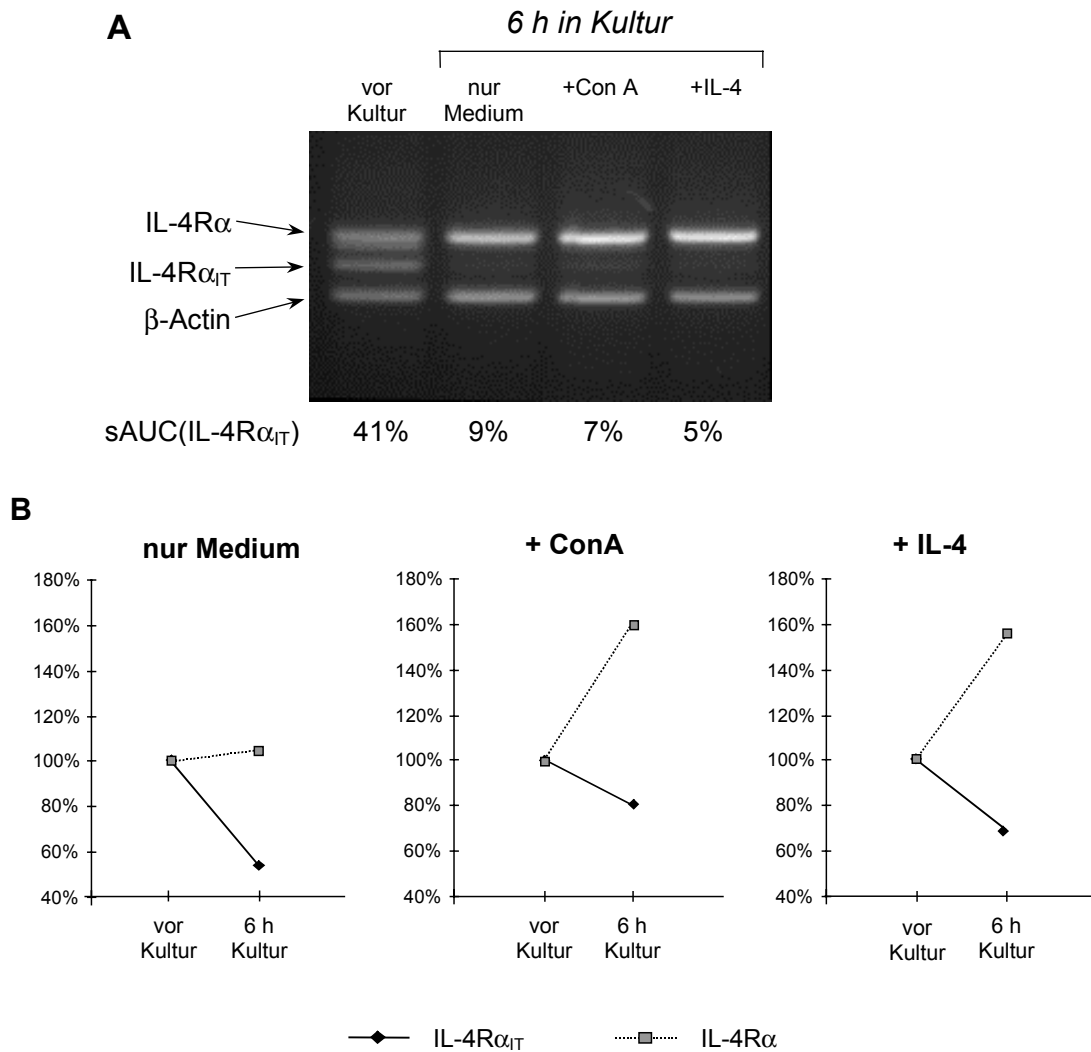


Abb. 30 Reversibilität der Zunahme der sAUC(IL-4R α_{IT}) nach Kultivierung der Zellen. Werden mononukleäre Zellen, die die IL-4R α_{IT} -mRNA nach einigen Tagen Stehen bei Zimmertemperatur relativ stark exprimieren, wieder in Kultur genommen, nimmt innerhalb weniger Stunden die sAUC(IL-4R α_{IT}) wieder deutlich ab (A). Die semiquantitative Bestimmung der Einzeltranskripte zeigt, daß die mRNA von IL-4R α_{IT} in diesen Zellen wieder herunterreguliert wird. Bei zusätzlicher Stimulation mit Concanavalin A oder IL-4 werden im Vergleich zu den Zellen ohne zusätzliche Stimulation beide Transkripte stärker exprimiert (B).

4.6 Biologische Funktion von IL-4R α_{IT}

Die Zellen der IL-3-abhängige Maus pro-B-Zelllinie Ba/F3 können bei Kultur in Wachstumsfaktor-freiem Medium nicht mehr proliferieren und unterziehen sich außerdem der Apoptose. Andere Wachstumsfaktoren, z.B. mIL-4, können die Funktion von IL-3 bis zu einem gewissen Maße ersetzen. In vielen Studien konnte bereits gezeigt werden, daß bei Transfektion von Ba/F3-Zellen mit dem hIL-4R auch durch hIL-4 Proliferation vermittelt und die Auslösung von Apoptose verhindert werden kann. An diesem dafür geeigneten Zellmodell wurde untersucht, inwiefern der aus der IL-4R α_{IT} mRNA entstehende verkürzte Rezeptor bei Bindung von IL-4 Signaltransduktion vermitteln kann. Ba/F3-Zellen wurden

dafür mit IL-4R α bzw. IL-4R α_{IT} transfiziert, die Zellen kloniert und mit den resultierenden Zellklonen unter Ersatz des mIL-3 durch humanes oder murines IL-4 Zellproliferations-Assays und Untersuchungen zur Apoptose der Zellen durchgeführt.

4.6.1 Transfektion von Ba/F3 mit pCR3.1-Uni, pCR3.1/IL-4R α und pCR3.1/IL-4R α_{IT}

Die gesamten kodierenden Bereiche von IL-4R α und IL-4R α_{IT} wurden mittels PCR aus der cDNA eines gesunden Probanden amplifiziert und in den eukaryontischen Expressionsvektor pCR3.1TM-Uni einkloniert. Nach Sequenzierung der resultierenden Vektorkonstrukte pCR3.1/IL-4R α und pCR3.1/IL-4R α_{IT} wurden Zellen der Maus-pro-B-Zelllinie Ba/F3 mit den aufgereinigten Vektoren korrekter Sequenz mittels Elektroporation transfiziert und die stabil transfizierten Zellen unter Zugabe des Antibiotikums G418 selektioniert.

Trotz Einsatzes einer DNA-Polymerase mit Proofreading-Aktivität wies der größte Teil der Inserts Polymerase-generierte Fehler in der Basen-Sequenz auf. Um einen Vektor mit fehlerfreiem Insert des vollständigen IL-4R α zu erhalten, wurden wie im Abschnitt 3.6.5 ausführlich beschrieben zwei Klone von pCR3.1TM-Uni-IL4R α mit fehlerhaften Sequenzen jeweils in anderen Bereichen des Inserts mit bestimmten Restriktionsendonukleasen geschnitten und die fehlerfreien Abschnitte religiert.

4.6.2 Nachweis der Expression von IL-4R α und IL-4R α_{IT}

Nach der Klonierung der Zellen wurden die Klone auf die Expression der gewünschten Rezeptoren überprüft. Die Integration der vollständigen Rezeptor-DNA und deren Expression auf mRNA-Ebene wurde durch Amplifizierung der gesamten kodierenden DNA bzw. cDNA nachgewiesen (Abb. 31). Um in den RNA-Präparationen Kontaminationen durch DNA auszuschließen und somit eine alleinige Amplifizierung von cDNA in der RT-PCR zu gewährleisten, wurde vor Durchführung der reversen Transkription ein DNase-Verdau der RNA durchgeführt. Der fehlende Nachweis eines Amplifikates bei direktem Einsatz der RNA in die PCR-Reaktion (Daten nicht dargestellt) sicherte den alleinigen Nachweis von cDNA bei der anschließend durchgeführten RT-PCR. Zusätzlich konnte mit Hilfe eines RNase Protection Assay die Expression der mRNA direkt nachgewiesen werden (Abb. 32).

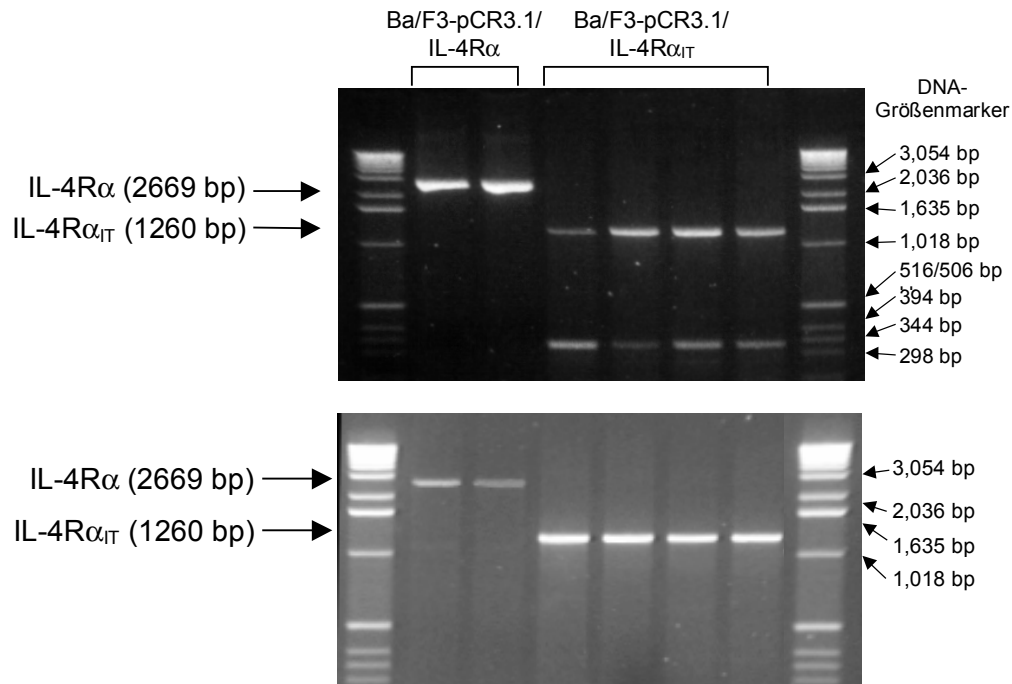


Abb. 31 Nachweis der Integration der gesamten kodierenden Sequenz der DNA (oben) bzw. Expression der mRNA (unten) von IL-4R α und IL-4R α_{IT} in den transfizierten Ba/F3-Zellen mittels PCR bzw. RT-PCR exemplarisch für einige Klone. Die in der PCR oben dargestellte zusätzliche kürzere Bande von ca. 340 bp ließ sich in der RT-PCR nicht beobachten, war aber auch in den untransfizierten Ba/F3-Zellen nachweisbar (nicht dargestellt) und stellt vermutlich ein unspezifisches Produkt aus dem Maus-eigenen Genom dar.

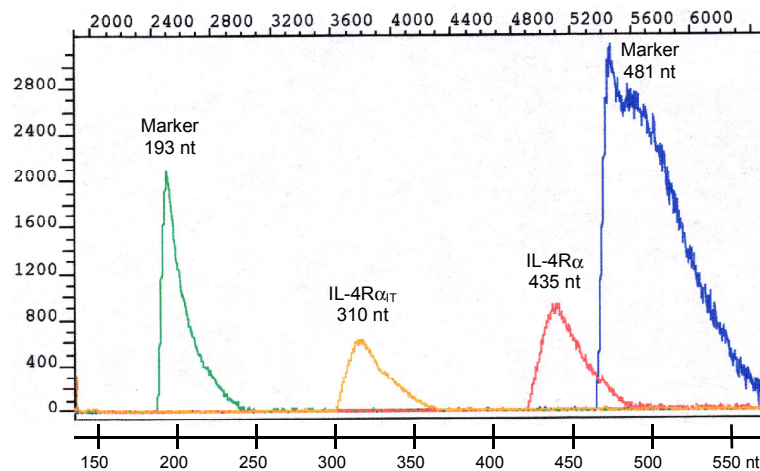


Abb. 32 RNase-Protection-Assay zum Nachweis der Expression der IL-4R α - und IL-4R α_{IT} -mRNA in den mit pCR3.1/IL-4R α und pCR3.1/IL-4R α_{IT} transfizierten Ba/F3-Zellen, exemplarisch dargestellt für je einen Zellklon.

Die Expression der Rezeptor-Proteine auf der Zelloberfläche wurde durchflußzytometrisch mit einem fluoreszenzmarkierten monoklonalen Antikörper nachgewiesen, der spezifisch an die humane IL-4R α -Kette bindet. Abb. 33 zeigt exemplarisch die Expression für je einen Klon der mit pCR3.1/IL-4R α bzw. pCR3.1/IL-4R α_{IT} transfizierten Zellen im Vergleich zu Zellen, die

mit dem leeren Vektor transfiziert wurden. Auf die Durchführung von IL-4-Bindungsstudien wurde verzichtet, da in anderen Studien bereits mehrfach gezeigt wurde, daß eine drastische Verkürzung der intrazellulären Domäne des IL-4R bei unverändertem extrazellulären Anteil die Affinität des Rezeptors zu seinem Liganden nicht beeinflusst [57, 58, 61, 114].

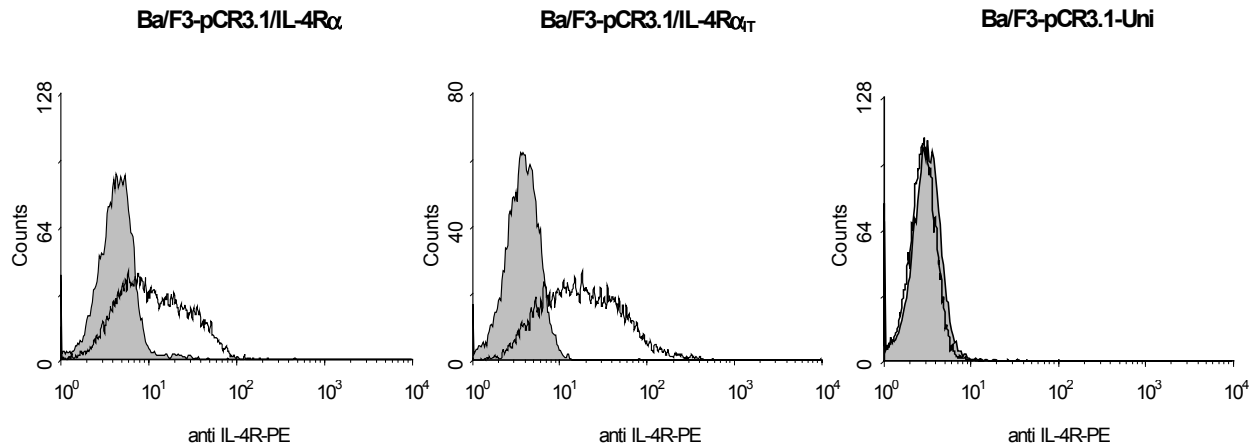


Abb. 33 Durchflußzytometrischer Nachweis der Expression von IL-4R α und IL-4R α_{IT} auf der Zelloberfläche der transfizierten Zellen exemplarisch für drei Klone. Der ausgefüllte Peak entspricht der Isotypkontrolle. Das Histogramm ganz rechts zeigt die fehlende Expression auf den mit dem leeren Vektor transfizierten Zellen.

Von den Klonen, die die transfizierten Rezeptoren sowohl auf mRNA- als auch auf Protein-Ebene exprimierten, wurden 21 mit pCR3.1/IL-4R α und 18 mit pCR3.1/IL-4R α_{IT} transfizierte Klone für die folgenden Proliferationsassays eingesetzt. Die mit dem leeren Vektor pCR3.1-Uni transfizierten Zellen wurden ohne weitere Klonierung als Negativkontrolle verwendet.

4.6.3 Proliferationsassays

Um zu untersuchen, ob bei Bindung von humanem IL-4 (hIL-4) an IL-4R α_{IT} Proliferation vermittelt werden kann, wurden mit den transfizierten Zellen Proliferationsassays unter IL-4 durchgeführt. Nach Kultur der Zellen für ca. 45 h in Medium mit unterschiedlichen Konzentrationen an humanem bzw. murinem IL-4 wurde mit dem MTS-Zell-Proliferationstest die Proliferation der Zellen gemessen. Dabei wurde das Proliferationsverhalten der mit IL-4R α_{IT} transfizierten Zellklone (Ba/F3-pCR3.1/IL-4R α_{IT}) unter hIL-4 mit dem unter murinem IL-4 (mIL-4) bzw. in wachstumsfaktorfreiem Medium verglichen. Außerdem wurde die Proliferation dieser Zellen unter hIL-4 mit der Proliferation der Zellklone verglichen, die mit dem vollständigen IL-4-Rezeptor (Ba/F3- pCR3.1/IL-4R α) bzw. mit dem leeren Vektor (Ba/F3-pCR3.1) transfiziert wurden.

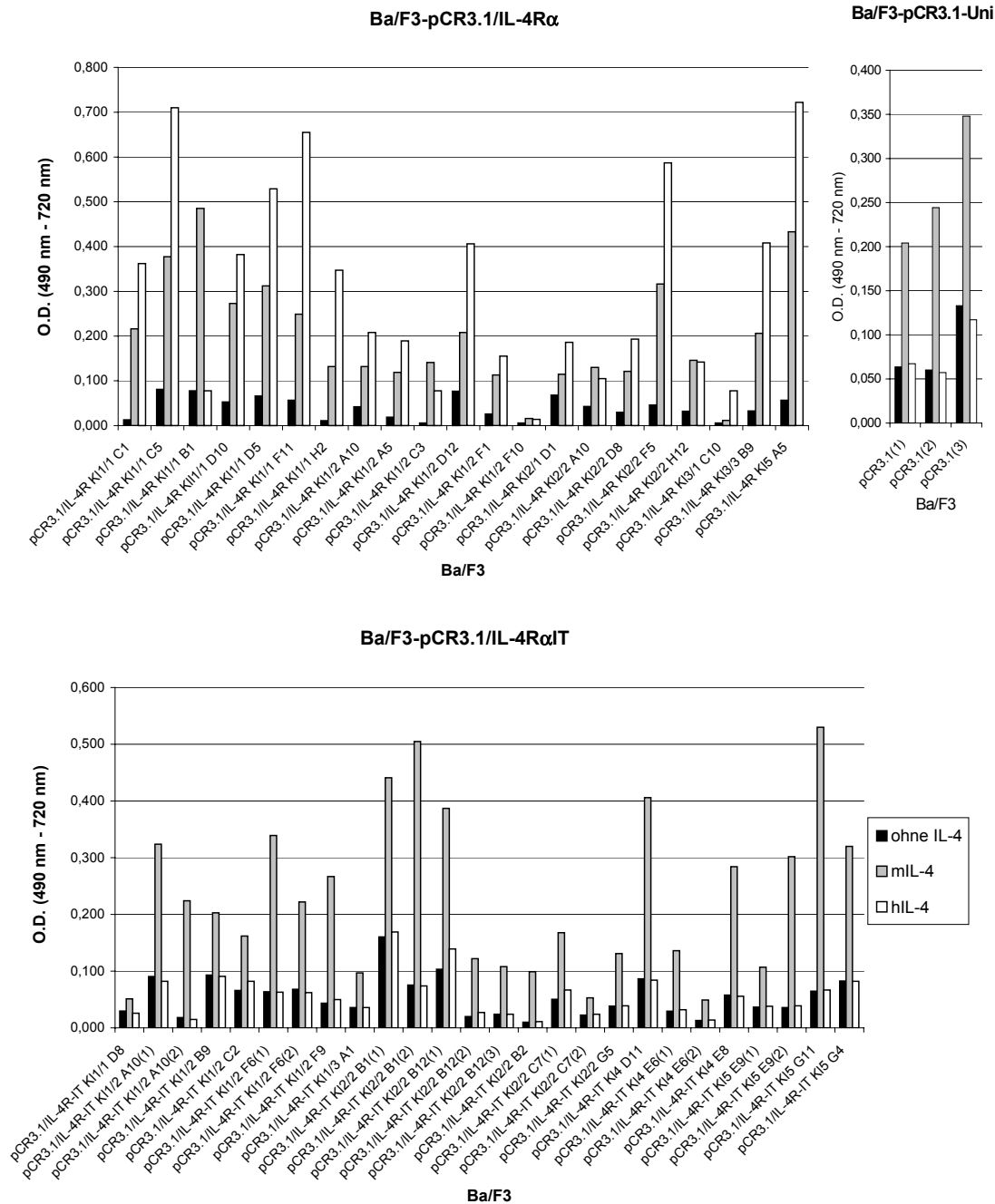


Abb. 34 Proliferationsverhalten der mit der vollständigen IL-4R α -Kette (oben), mit der Splice-Variante IL-4R α _{IT} (Mitte) und der mit dem leeren Vektor pCR3.1-Uni (links) transfizierten Ba/F3-Zellen unter Stimulation mit hIL-4 im Vergleich zu mIL-4 (4 ng/ml) über 42-48 Stunden. Mit Ausnahme eines Klonen (Pfeil) proliferierten unter hIL-4 alle mit IL-4R α transfizierten Klone, größtenteils stärker als unter mIL-4, während die mit der Splice-Variante und erwartungsgemäß auch die mit dem leeren Vektor transfizierten Zellen unter hIL-4 kein Wachstum zeigten.

In der Abb. 34 ist das Proliferationsverhalten der Zellen ohne Wachstumsfaktor bzw. unter 4 ng/ml murinem oder humanem IL-4 nach Kultivierung über 42-48 h dargestellt. Im Vergleich zu den ohne Wachstumsfaktor kultivierten Zellen proliferierten unter der Stimulation mit mIL-4 alle untersuchten Zellklone. Von den 21 untersuchten Klonen, die den transfizierten humanen IL-4R α voller Länge exprimierten, proliferierten 20 Klone unter der

Zugabe von hIL-4, in den meisten Fällen stärker als unter mL-4, nur ein Klon zeigte kein Wachstum. Dagegen war bei keinem der 18 Zellklone, die mit der Splice-Variante transfiziert worden waren, eine eindeutige Proliferation unter hIL-4 zu verzeichnen. Nur in wenigen Fällen schienen sie unter hIL-4 eine geringfügiges Wachstum zu zeigen, dies war jedoch bei Wiederholung der Versuche nicht reproduzierbar (Abb. 34). Auch unter sehr hohen hIL-4-Konzentrationen von 20 ng/ml zeigte sich keine Proliferation der mit der Splice-Variante transfizierten Zellen. Wie erwartet zeigten auch die mit dem leeren Vektor transfizierten Zellen unter hIL-4 keine Proliferation, während das Wachstum unter mL-4 unbeeinflusst war.

In der Abb. 35 ist exemplarisch für je einen mit IL-4R α , IL-4R α_{IT} und mit dem leeren Vektor transfizierten Zellklon die Abhängigkeit der Proliferation der Zellen von der IL-4-Konzentration im Medium dargestellt.

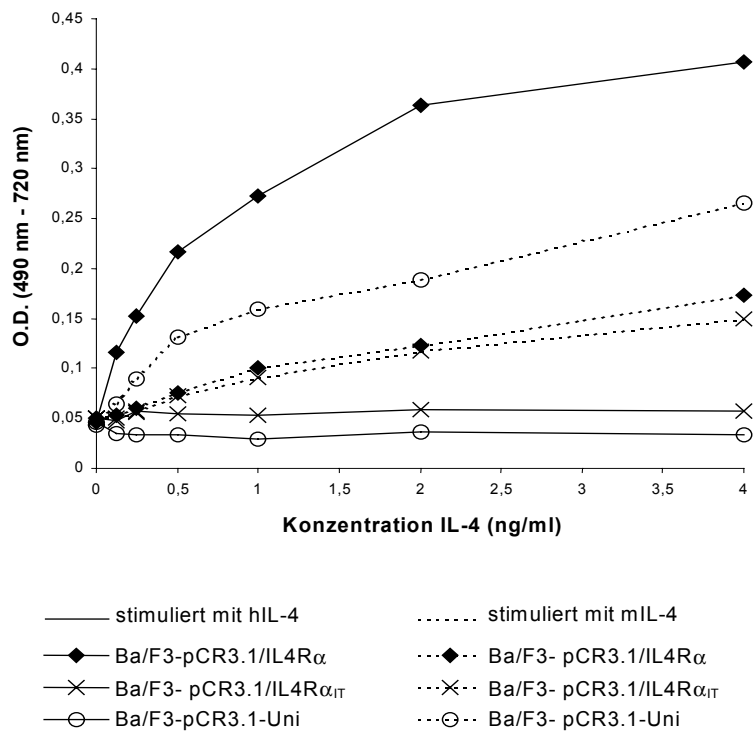


Abb. 35 Messung der Proliferation der mit IL-4R α , IL-4R α_{IT} oder dem leeren Vektor transfizierten Ba/F3-Zellen unter Stimulation mit mL-4 und hIL-4 in unterschiedlichen Konzentrationen exemplarisch für je einen Zellklon. Alle Klone proliferierten wie erwartet konzentrationsabhängig unter mL-4. Der mit dem vollständigen hIL-4R α transfizierte Klon zeigt unter hIL-4 ebenfalls Wachstum, während der mit der Splice-Variante und der mit dem leeren Vektor transfizierte Zellklon unter hIL-4 nicht proliferierten. Dargestellt sind jeweils die gemittelten Werte aus drei Messungen.

Die Spezifität der Wirkungen von humanem und murinem IL-4 auf ihre jeweiligen Rezeptoren wurde durch Stimulationsversuche mit und ohne Zugabe eines spezifischen blockierenden Antikörpers gegen den humanen IL-4R α bestätigt. Wie in der Abb. 36 dargestellt, wird die hIL-4-vermittelte Proliferation der Zellen durch den Zusatz des Antikörpers verhindert, während das durch mL-4 vermittelte Wachstum durch die Zugabe des anti-hIL-4R α -Antikörper weitgehend unbeeinflusst bleibt.

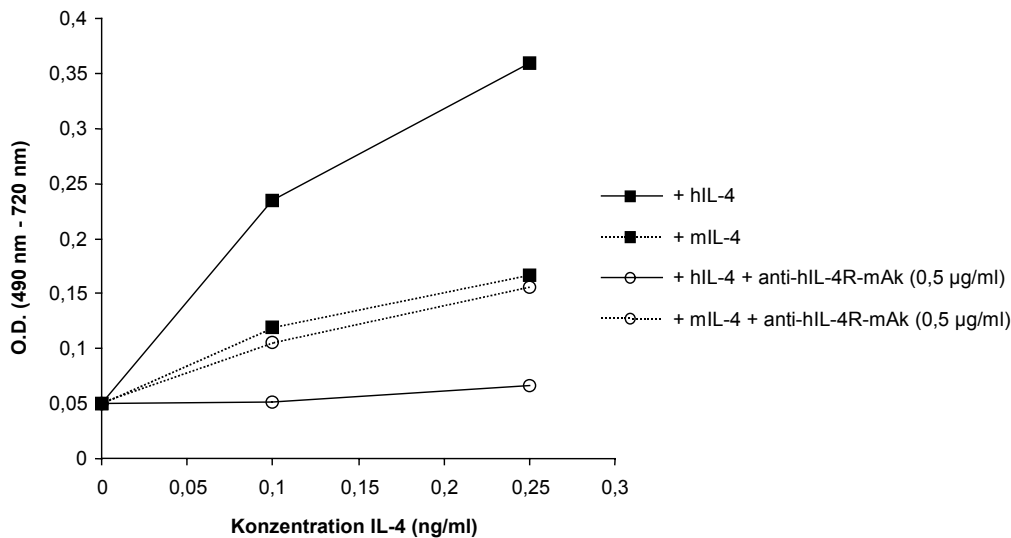


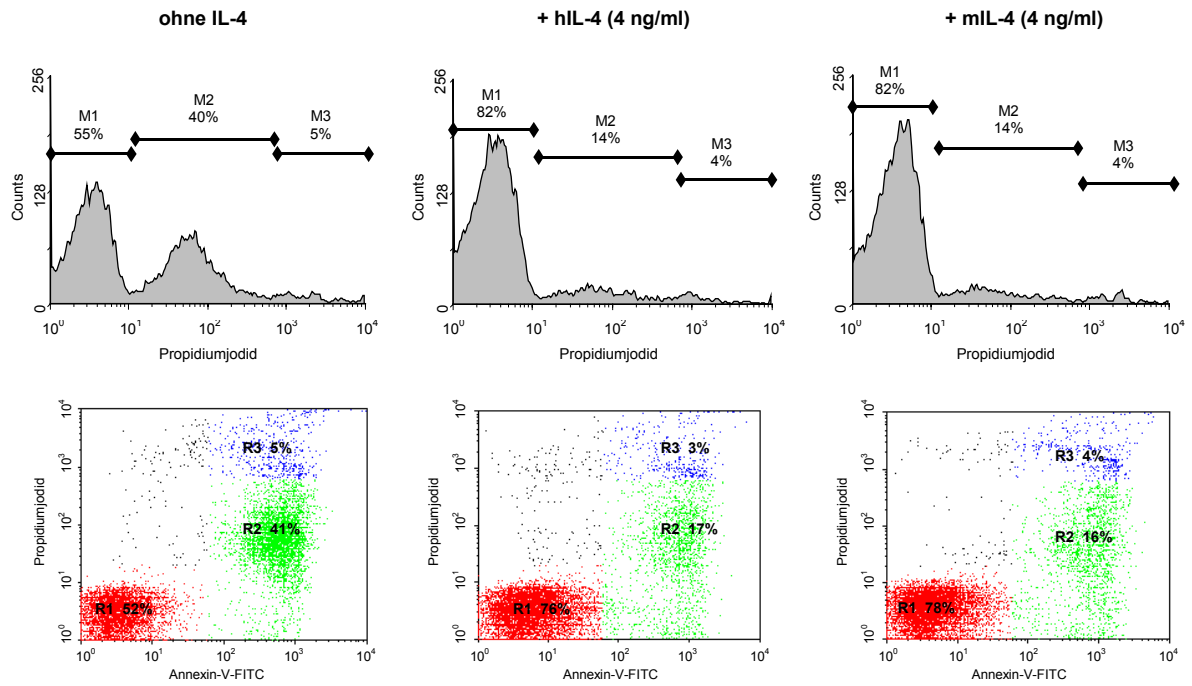
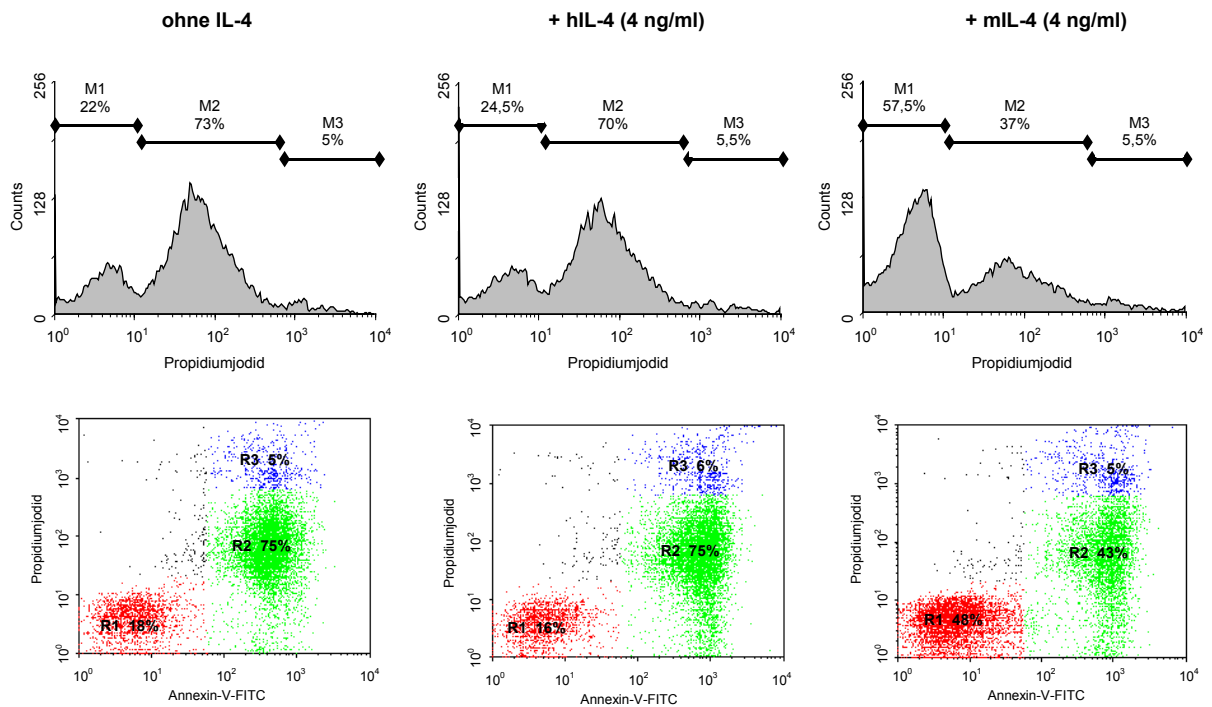
Abb. 36 Hemmung der hIL-4-vermittelten Proliferation eines mit dem vollständigen hIL-4R α transfizierten Ba/F3-Zellklones durch einen für den hIL-4R α spezifischen monoklonalen Antikörper. Der Antikörper hemmt nicht die über den mIL-4R vermittelte Proliferation durch mIL-4.

4.6.4 Apoptose der transfizierten Zellen unter IL-4-Stimulation

Mit der Kombination zweier sich ergänzender durchflußzytometrischer Methoden wurde untersucht, inwiefern in den transfizierten Zellen unter Stimulation mit hIL-4 die IL-4R α_{IT} -Variante im Vergleich zum vollständigen IL-4R α und im Vergleich zur Stimulation mit mIL-4 die Induktion von Apoptose verhindern kann.

Zellklone, die mit dem vollständigen IL-4R α , mit der Variante IL-4R α_{IT} oder mit dem leeren Vektor transfiziert worden waren, wurden zu diesem Zweck in Medium unter Zugabe von hIL-4, mIL-4 oder ohne Wachstumsfaktor für 24 h kultiviert. Der Anteil der apoptotischen Zellen wurde durch die Anfärbung mit Annexin V-FITC in Kombination mit Propidiumjodid durchflußzytometrisch bestimmt.

In der Darstellung im Histogramm mit Propidiumjodid als alleinigem Farbstoff können die Zellen in den sehr frühen Stadien der Apoptose, in denen die Zellmembran noch intakt ist und daher der DNA-Farbstoff nicht in die Zelle eindringen kann, nicht von den vitalen Zellen unterschieden werden. Wie die Abb. 37 zeigt, war der Anteil dieser Zellen jedoch in den durchgeführten Versuchen gering, so daß sich das Ergebnis der Auswertung der Versuche nicht entscheidend von der zweiparametrischen Darstellung im Dot Plot in der Färbung mit Annexin V-FITC und Propidiumjodid unterschied. Der Anteil der nekrotischen Zellen ließ sich in beiden Darstellungen von den apoptotischen Zellen abgrenzen und betrug in allen Versuchen ca. 3 bis 7%.

A**Ba/F3-pCR3.1/IL-4R α** **B****Ba/F3-pCR3.1/IL-4R α_{IT}** 

C

Ba/F3-pCR3.1

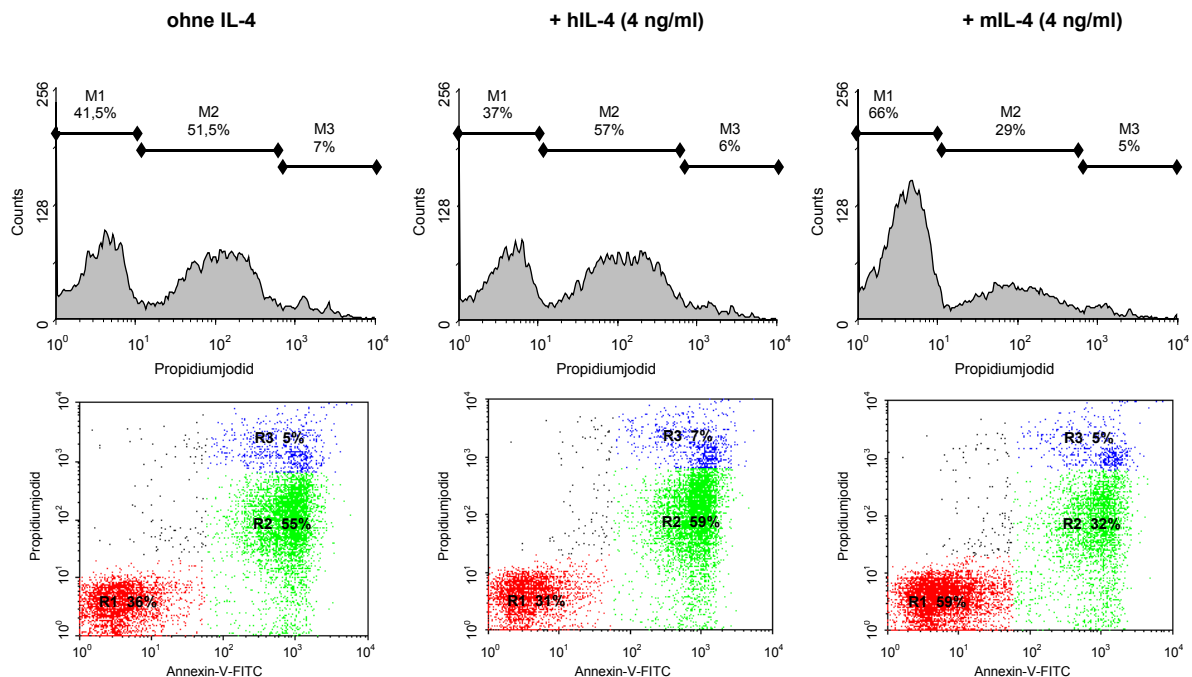


Abb. 37 Messung der Apoptose der mit IL-4R α (A), IL-4R α_{IT} (B) bzw. dem leeren Vektor (C) transfizierten Zellklone nach Kultur in wachstumsfaktorfreiem Medium oder unter Stimulation mit humanem oder murinem IL-4 über 24 h. Dargestellt sind jeweils die Färbung mit Propidiumjodid als Histogramme und die dazugehörige Zweiparameter-Darstellung der Markierung mit Annexin-V-FITC gegen die Propidiumjodid-Färbung. Beide Darstellungen geben prinzipiell dieselbe Aussage wieder. Der Anteil der apoptotischen Zellen des mit IL-4R α transfizierten Zellklones entspricht unter hIL-4 etwa dem Anteil unter mIL-4, während ohne Wachstumsfaktor zu dem Zeitpunkt ein sehr viel größerer Anteil der Zellen apoptotisch ist. Sowohl in den mit IL-4R α_{IT} als auch bei den mit dem leeren Vektor transfizierten Zellen kann durch hIL-4 die Auslösung der Apoptose in den Zellen nicht verhindert werden. Der Anteil der apoptotischen Zellen ist unter hIL-4 deutlich größer als unter mIL-4 und damit genauso hoch wie ohne Wachstumsfaktor. Die jeweils etwas höheren Werte der Regionen R2 im Vergleich zu M2 der Histogramme und der Bereiche M1 der Histogramme im Vergleich zu den Regionen R1 in den Dot Plots ergeben sich durch die bereits durch Annexin-V-FITC markierten Zellen in sehr frühen Phasen der Apoptose, die sich mit Propidiumjodid noch nicht anfärben lassen und so in den Histogrammen zu den vitalen Zellen gezählt werden. Der Anteil dieser Zellen ist jedoch stets sehr gering und ändert nichts an der Gesamtaussage der Versuche.

Prinzipiell zeigen sowohl die einparametrische Histogrammdarstellung der Propidiumjodid-Färbung als auch die Zweiparameter-Darstellung im Dot-Plot mit der Annexin V-Färbung als zusätzlichem Parameter die gleichen Ergebnisse. Bei Stimulation eines Ba/F3-Zellklones, der mit dem vollständigen humanen IL-4R α transfiziert wurde, war der Anteil der apoptotischen Zellen unter hIL-4 und mIL-4 identisch, während bei Kultivierung in wachstumsfaktorfreiem Medium der Anteil deutlich höher lag (Abb. 37A). Über die Rezeptor-Variante IL-4R α_{IT} dagegen konnte durch hIL-4 kein Apoptose-Schutz vermittelt werden. Der Anteil der apoptotischen Zellen unter Stimulation eines mit der Splice-Variante transfizierten Zellklones mit mIL-4 war deutlich geringer als der Anteil unter hIL-4, der etwa dem ohne

Wachstumsfaktor entsprach (Abb. 37B). Dasselbe Ergebnis zeigte sich auch bei der Untersuchung der mit dem leeren Vektor transfizierten Zellen (Abb. 37B). In der Abb. 38 sind diese Ergebnisse zusammenfassend in einem Diagramm dargestellt.

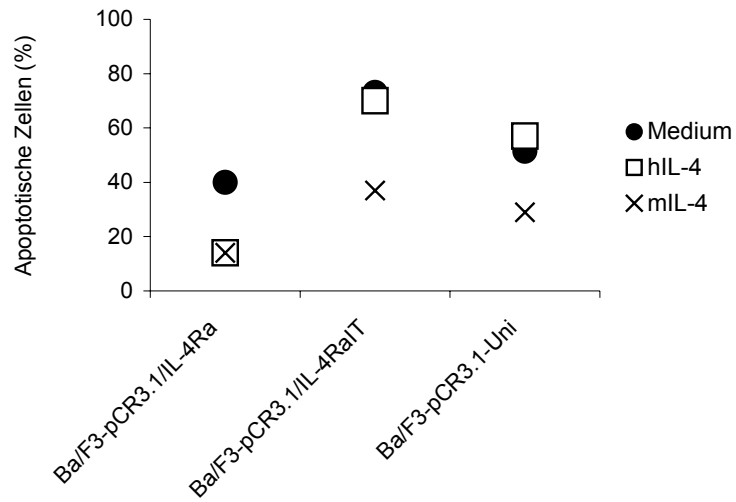


Abb. 38 Zusammenfassende graphische Darstellung der Untersuchung des Anteils apoptotischer Zellen unter Stimulation mit hIL-4, mL-4 oder ohne Wachstumsfaktor. Zur Erläuterung siehe Abb. 37.

5 DISKUSSION

5.1 Probleme der Methoden

5.1.1 Kompetitive und semiquantitative RT-PCR

Bei dem Versuch, mRNA zu quantifizieren, tauchen sehr schnell Probleme auf, die Zweifel an der Validität der Methoden aufkommen lassen. Die Problematik beginnt damit, daß eine Probe präparierter RNA in Abhängigkeit von der Menge der eingesetzten Zellen, der Methode der Aufarbeitung und aufgrund von Degradierungsprozessen auch abhängig von Alter und Lagerung der Probe sehr unterschiedliche RNA-Konzentrationen enthalten kann. Auch die Reaktion der reversen Transkription kann eine sehr variable Effektivität haben, die vor allem in der Empfindlichkeit der Reversen Transkriptase gegenüber in der RNA-Präparation verbliebenen Salzen, Alkohol oder Phenol begründet liegt. Die Quantifizierung einer bestimmten mRNA kann also nur gelingen, wenn eine Bezugsgröße bekannt ist, die die Menge an eingesetzter Gesamt-mRNA bzw. -cDNA widerspiegelt

Eine solche Bezugsgröße könnte die Expression einer anderen mRNA darstellen. Von dieser mRNA, die damit als ein interner Standard eingesetzt wird, wird gefordert, daß sie in den untersuchten Zellen konstant exprimiert wird. Diese Bedingungen werden von verschiedenen konstitutiv exprimierten Genen, den sogenannten „*housekeeping*“-Genen, wie z.B. β -Actin oder GAPDH, erfüllt. Mit Hilfe einer derartigen mRNA als internem Standard ist es möglich, die unterschiedliche Expression einer anderen mRNA in verschiedenen Proben in Relation zueinander zu quantifizieren. Da jedoch der interne Standard keine absolute Bezugsgröße darstellt, muß eine solche Quantifizierung immer als semiquantitativ angesehen werden.

Beim Vergleich von RT-PCR-Produkten unterschiedlicher mRNAs ist in die Interpretation der Ergebnisse miteinzubeziehen, daß unterschiedliche cDNAs in einer PCR nicht unbedingt in gleichem Maße amplifiziert werden. Diese Unterschiede sind vor allem durch die Verwendung spezifischer und damit unterschiedlicher Primer für die verschiedenen *templates* begründet. Erscheint beim Einsatz unterschiedlicher Primerpaare nach Amplifizierung eine Bande stärker als eine andere, muß die dazugehörige mRNA also nicht notwendigerweise stärker exprimiert werden. Ein direkter Vergleich unterschiedlicher mRNAs miteinander ist daher nicht möglich.

Anders ist die Situation allerdings in einer kompetitiven PCR, in welcher unterschiedliche cDNAs mit demselben Primerpaar amplifiziert werden, wie bei der Amplifizierung der cDNAs von IL-4R α und IL-4R α_{IT} in dieser Arbeit. Hier konkurrieren beide *templates* unter denselben

PCR-Bedingungen um dasselbe Primerpaar, und die PCR-Produkte unterscheiden sich einzig in ihrer Länge voneinander. Es ist vorstellbar, daß dem kürzeren Fragment dadurch während der Elongation ein Vorteil zukommt. Dies ist jedoch bei ausreichend lang gewählten Elongationszeiten und einer nur geringen Längendifferenz der beiden Fragmente vernachlässigbar.

Erscheinen also nach Amplifizierung durch eine kompetitive RT-PCR zwei Banden gleich stark, kann damit auf eine identische Menge der beiden amplifizierten cDNAs bzw. zugrundeliegenden mRNAs in der untersuchten Probe rückgeschlossen werden. Bei unterschiedlichen Mengen der *templates* verhalten sich die Produktmengen und damit die optische Dichte der resultierenden Banden nach Amplifizierung jedoch nicht proportional zu den zugrundeliegenden mRNA-Mengen, da durch die Konkurrenzreaktionen der beiden *templates* um die Substrate in der PCR das in größerer Menge vorliegende *template* einen überproportionalen Vorteil gewinnt.

Dasselbe Phänomen zeigt sich auch bei der Amplifizierung von zwei oder mehr cDNAs mit unterschiedlichen Primerpaaren in einem Ansatz im Sinne einer Duplex- oder Multiplex-PCR. Hier konkurrieren die *templates* zwar nicht um dieselben Primer, aber dennoch um andere Substrate wie Enzym und Nukleotide. Dies fällt insbesondere dann ins Gewicht, wenn die beiden *templates* in sehr unterschiedlichen Konzentrationen in der Probe vorliegen. Die Vermeidung dieser gegenseitigen Beeinflussung war einer der Gründe, weshalb in dieser Arbeit bei der Quantifizierung mit einem internen Standard die zu quantifizierende cDNA und der interne Standard GAPDH in unterschiedlichen Ansätzen amplifiziert wurden.

Die Aussagen, die bei der Anwendung der beiden oben erwähnten Möglichkeiten der Quantifizierungen mittels PCR gemacht werden können, sind sehr unterschiedlich. Bei der kompetitiven RT-PCR ist es zwar möglich, die amplifizierten *templates* direkt miteinander zu vergleichen und somit unter Berücksichtigung der oben erwähnten Einschränkungen auch bis zu einem gewissen Grade etwas über das Mengenverhältnis der beiden zugrundeliegenden mRNAs auszusagen. Vergleicht man aber mehrere Proben mit unterschiedlichem Verhältnis der beiden kompetitiv amplifizierten *templates* untereinander, läßt sich mit diesem Ansatz nicht entscheiden, welche Expressionsunterschiede der mRNAs zwischen den Proben dafür verantwortlich sind. Angaben darüber sind jedoch möglich, wenn die Expression der zu quantifizierenden mRNAs in Bezug zu einem internen Standard gesetzt wird.

In diesem Fall wird gefordert, daß dieser interne Standard in den Zellen konstant exprimiert wird bzw. den allgemeinen Aktivitätsstatus der Zellen widerspiegelt. Die sich daraus ergebenden Probleme sind offensichtlich. Sicherlich wird sich in einem dynamischen System wie dem einer Zelle keine mRNA finden lassen, die unabhängig von äußeren Einflüssen

exprimiert wird, so daß diesbezüglich immer Kompromisse eingegangen werden müssen und eine solche Quantifizierung damit immer in Relation zu dem gewählten internen Standard gesehen werden muß.

Besonders problematisch gestaltete sich in der vorliegenden Arbeit aus den genannten Gründen die Quantifizierung der beiden IL-4R α -Splice-Varianten in den Versuchen zu den mRNA-Stabilitäten unter Transkriptionshemmung mit Actinomycin D. Die mRNA des gewählten internen Standards GAPDH wird in diesen Versuchen selbstverständlich auch degradiert. In eigenen Versuchen zur mRNA-Stabilität, in denen Proben identischer Zellzahl nach Zugabe von Actinomycin D bei 37°C über unterschiedliche Zeiträume inkubiert wurden, zeigte sich allerdings, daß die GAPDH-mRNA insbesondere im Verhältnis zu den mRNAs von IL-4R α und IL-4R α_{IT} über den untersuchten Zeitraum hinweg sehr stabil zu sein schien. Aufgrund der Notwendigkeit, daß eine interne Bezugsgröße gebraucht wird, wurde daher auch in diesen Versuchen GAPDH als interner Standard benutzt.

Desweiteren stellt sich die Frage, inwiefern sich die Expression der GAPDH-mRNA bei den verzögert aufgearbeiteten Proben verändert. Idealerweise ist deren Expression in den Proben konstant. Aber auch in diesem Fall ist aus den oben erläuterten Gründen die Interpretation dieser Quantifizierung kritisch zu betrachten und die in diesen Versuchen beobachteten Veränderungen der Expression von IL-4R α und IL-4R α_{IT} im Verhältnis zur Expression von GAPDH zu sehen.

Bei der Untersuchung von Patientenmaterial wurde in den Ansätzen β -Actin mitamplifiziert, da ursprünglich geplant war, zusätzlich zur Quantifizierung der beiden IL-4R α -Splice-Varianten in Relation zueinander die Expressionsunterschiede der Varianten zwischen den Proben semiquantitativ mit β -Actin als internem Standard zu bestimmen. Dabei zeigte sich, daß die Produkte nur gut miteinander verglichen werden können, solange sie aus einem gemeinsamen *master mix* entstanden sind, der alle Substrate außer der cDNA enthält. Reaktionsansätze aus unterschiedlichen *master mixes* zeigten jedoch ausgeprägte Schwankungen im Mengenverhältnis der Produkte von β -Actin zu den IL-4R α -Varianten. Die Ursache hierfür ist die starke Expression der *housekeeping*-Gene, die in einem solchen Duplex- bzw. Multiplex-RT-PCR-Ansatz nur durch den Einsatz sehr geringer Primer-Mengen ausgeglichen werden kann. Daraus resultiert, daß sehr geringe Schwankungen dieser Primer-Mengen im PCR-Ansatz deutliche Unterschiede in den resultierenden Produktmengen ergeben. Aus diesem Grunde wurde in den untersuchten Patientenproben ausschließlich das Verhältnis der Produkte von IL-4R α und IL-4R α_{IT} zueinander ausgewertet. Diese Ergebnisse waren auch bei mehrfacher Wiederholung der Versuche gut reproduzierbar.

Die *housekeeping*-Gene werden in den Zellen so stark exprimiert, daß auch beim Einsatz sehr geringer Primermengen nach Amplifizierung der Sättigungsbereich erreicht und daher keine quantitative Differenzierung zwischen den Proben mehr möglich ist. Dieses Problem läßt sich lösen, indem die cDNA verdünnt eingesetzt wird. Bei der Durchführung einer Duplex-PCR reichte die Konzentration der zu quantifizierenden cDNA von IL-4R α und insbesondere von IL-4 R α_{IT} in vielen Fällen nach der Verdünnung der cDNA nicht aus, um eine auswertbare Bande zu ergeben. Dies war ein weiteres Argument dafür, in der semiquantitativen RT-PCR internen Standard und zu quantifizierende cDNA in unterschiedlichen Ansätzen zu amplifizieren, da somit die Möglichkeit besteht, für internen Standard und zu quantifizierende cDNA unterschiedliche Verdünnungen zu wählen. Voraussetzung dabei ist natürlich, daß der Verdünnungsfaktor der zu vergleichenden Proben jeweils derselbe ist.

5.1.2 RNase Protection Assay

In der vorliegenden Arbeit wurde versucht, eine nicht radioaktive Anwendung des RNase Protection Assay zu etablieren. Die Sonden wurden dafür mit einem Fluoreszenz-Farbstoff markiert und die Produkte nach gelelektrophoretischer Auftrennung im ABI PrismTM 373 (PE, Applied Biosystems, Weiterstadt) detektiert und mit der GeneScan Analysis Software (Version 1.2.2-1) ausgewertet.

Etabliert wurde die Methode an *in vitro*-transkribierten RNA-Fragmenten, was zu zufriedenstellenden Ergebnissen führte. Bei der Anwendung zum Nachweis der IL-4R α und IL-4R α_{IT} mRNA in Zellen zeigte sich jedoch, daß die Sensitivität der Methode trotz Einsatzes großer RNA Mengen von bis zu 100 μ g nur für den Nachweis stark exprimierter mRNAs ausreichte.

Ursächlich dafür ist wahrscheinlich, daß die Fluorescein-12-UTP modifizierten Nukleotide die RNA-RNA Duplexe, bestehend aus RNA-Sonden und komplementärem mRNA-Bereich, destabilisieren, so daß schon bei Anwendung nur geringer Mengen RNase nicht nur die einzelsträngigen Sonden-Bereiche sondern auch die Sonden innerhalb der hybridisierten Region verdaut werden. Dieses Problem konnte bis zu einem bestimmten Punkt durch den Einsatz geringerer Mengen an RNase A und dafür mehr RNase T1 ausgeglichen werden. Dennoch reichte die Sensitivität dieser Methode nicht aus, um die natürlicherweise in den Zellen exprimierte IL-4R α bzw. IL-4R α_{IT} -mRNA nachzuweisen. In den mit IL-4R α bzw. IL-4R α_{IT} transfizierten Zellen wurden die transfizierten Gene jedoch ausreichend exprimiert, so daß hier die Detektion der jeweiligen mRNA mit dieser Methode gelang.

5.2 Charakterisierung der Splice-Variante IL-4R α _{IT}

In der Familie der Zytokin-Rezeptoren sind in den letzten Jahren diverse alternativ gespleißte mRNAs neu entdeckt worden. Häufig ist die Struktur des resultierenden Rezeptors durch Verlust essentieller Domänen entscheidend verändert und läßt auf eine geänderte Funktion dieser Rezeptor-Variante schließen. In manchen Fällen liegen die Konsequenzen, die die Veränderungen der Struktur nach sich ziehen, auf der Hand. Als Beispiel sei der Verlust der transmembranösen Domäne genannt, der durch fehlende Verankerung in der Zellmembran zu einem löslichen Rezeptor-Protein führt. Aber sogar in diesem Fall können den löslichen Rezeptoren unterschiedliche Funktionen zugeordnet werden [118]. So können sie z.B. als Bindungsproteine dienen, die ihren Liganden extrazellulär stabilisieren, oder sie antagonisieren die Rezeptor-vermittelte Wirkung durch Konkurrenz mit den membranständigen Rezeptoren um die Bindung des Liganden. Eine weitere Funktion eines löslichen Rezeptors kann darin bestehen, durch Bindung seines spezifischen Liganden in Assoziation mit einer membranständigen Rezeptorkette die Übermittlung von Signalen in Zellen zu ermöglichen, die den membrangebundenen Liganden-spezifischen Rezeptor nicht exprimieren. Ein Beispiel hierfür ist der lösliche IL-6R, der im Komplex mit IL-6 und der membranständigen Rezeptorkette gp130, die alleine IL-6 nicht binden kann, auch in Zellen, die die IL-6R-Kette nicht exprimieren, Signaltransduktion vermitteln kann.

Noch schwerer ist die Funktion der durch alternatives Splicing resultierenden Rezeptor-Proteine vorherzusagen, wenn bestimmte Regionen der intrazellulären Kette strukturell verändert sind. Vielen intrazellulären Domänen konnten bereits Aufgaben bei der Signaltransduktion zugeschrieben werden, so daß bei Strukturänderungen in diesen Regionen Vermutungen über die Auswirkungen gemacht werden können. Dennoch ist die Funktion einer großen Anzahl von Domänen noch nicht definiert, was eine Einschätzung der Konsequenz einer Strukturänderung erschwert. Desweiteren kann es bei Änderung der Primärstruktur eines Proteins zu unvorhersehbaren Änderungen der dreidimensionalen Struktur kommen, die die Funktion von erhaltenen funktionellen Domänen verändern. Nicht zuletzt darf nicht vernachlässigt werden, daß die Möglichkeit besteht, daß durch Verschiebung des Leserasters neu entstandene Peptidstrukturen die Funktion des Rezeptors entscheidend verändern können.

Der in dieser Arbeit identifizierten alternativ gespleißten mRNA des IL-4R α fehlt ein komplettes Exon von 50 bp, das innerhalb der zytoplasmatischen Domäne 82 bp *downstream* des Bereiches gelegen ist, der für die Transmembranregion kodiert. Dies führt zu einer Verschiebung des Leserasters und dadurch nach weiteren 64 bp zur Entstehung eines *in frame*-Stop-Codons (Abb. 17). Das bei Translation dieser mRNA resultierende Protein ist ein stark verkürzter membranständiger Rezeptor, dem der größte Teil der

zytoplasmatischen Domäne fehlt. Die extrazelluläre Region, die Transmembranregion und die ersten 27 Aminosäuren der zytoplasmatischen Domäne sind unverändert, daran schließt sich, bedingt durch die Leseraster-Verschiebung, ein kurzes Stück von 21 neuen Aminosäuren an, dem dann ein Kettenabbruch folgt. Die verbleibende intrazelluläre Sequenz enthält die Homologie-Box 1, weitere Domänen, die bisher als für die Signaltransduktion wichtig charakterisiert wurden, fehlen (Abb. 17).

In der veröffentlichten Literatur ist eine solche Variante des humanen IL-4R α bisher weder als mRNA noch als Protein beschrieben. Bei der Maus ist ein alternativ gespleißtes Transkript des IL-4R α bekannt, das allerdings durch Einführen eines Stop-Codons vor die Transmembranregion für ein lösliches Rezeptor-Protein kodiert [125]. Desweiteren ist ein humanes lösliches IL-4R α -Protein beschrieben worden. Ob dieses Protein durch Proteolyse oder ebenfalls durch alternatives Splicing entsteht, ist unklar. Eine korrespondierende mRNA konnte bisher jedenfalls noch nicht identifiziert werden [126].

Bei Betrachtung der potentiellen Proteinstruktur von IL-4R α_{IT} , stellen sich die Fragen, ob ein solcher Rezeptor auf der Zelloberfläche exprimiert werden und IL-4 binden kann und inwieweit er bei Bindung von IL-4 zur Signaltransduktion beitragen kann. Verschiedene Transfektionsstudien mit IL-4R α -Mutanten zeigten, daß Rezeptor-Isoformen mit Deletionen innerhalb der intrazellulären Domäne, selbst wenn die gesamte intrazelluläre Region fehlte, ausnahmslos an der Zelloberfläche exprimiert werden und IL-4 binden konnten [48, 61, 65], so daß von vornherein davon auszugehen war, daß auch eine Expression von IL-4R α_{IT} an der Zelloberfläche möglich ist.

Weniger klar sind die Schlußfolgerungen, die aus den theoretischen Überlegungen dazu gezogen werden können, ob IL-4R α_{IT} fähig ist, Signaltransduktion zu vermitteln. Wie bereits im Kapitel „Funktionelle Domänen des IL-4R“ (Abschnitt 1.2.3) erläutert, ergeben die Studien mit Mutationskonstrukten des IL-4R α zur Identifizierung funktioneller Domänen uneinheitliche Ergebnisse, die somit nicht zulassen, eindeutige Parallelen zu der Struktur und einer sich daraus ergebenden Funktion von IL-4R α_{IT} zu ziehen.

IL-4R α_{IT} besitzt, wie oben erwähnt, in seiner kurzen zytoplasmatischen Domäne als einzige der bisher charakterisierten funktionellen Domänen die Prolin-reiche Homologie-Box 1, die als Bindungsstelle für JAK1 dient. In allen veröffentlichten Studien, die sich mit der Funktion dieser Domäne beschäftigen, zeigte sich übereinstimmend, daß diese Struktur für die Proliferation der Zelle und die differenzierenden Signale, gemessen an der STAT6-Aktivierung, essentiell ist [58, 63, 65]. Die Deletion dieses Motives oder die Mutation der in ihr enthaltenen Prolin-Reste führte ausnahmslos zu einem Verlust dieser Eigenschaften. Auch eine JAK-Aktivierung konnte in den Studien nicht beobachtet werden [63, 65, 127].

Die weiteren als funktionelle Domänen identifizierten Regionen, insbesondere die weiter C-terminal gelegene Glutaminsäure-reiche Sequenz (ca. AS 360-390), fehlen der IL-4R α Splice-Variante. Auch die Deletion dieser Region führte regelmäßig zu einem Verlust der proliferierenden Eigenschaften, wobei die Ergebnisse im Hinblick auf eine Aktivierung der Januskinasen uneinheitlich sind [58, 61, 62, 63]. Für die Aktivierung von STAT6 scheint dieses Motiv ebenfalls essentiell zu sein, auch wenn sich die Studien dahingehend widersprechen, ob es für die STAT6-Aktivierung zusammen mit der Box 1 ausreichend ist [57, 59, 63, 65].

Gale *et al.* hat ein Splice-Variante der *common beta chain* (β_C), der gemeinsamen Rezeptorkette der Rezeptoren für GM-CSF, IL-3 und IL-5, beschrieben [112], deren Struktur analog zu der des IL-4R α_{IT} aufgebaut ist. Die resultierende Proteinisoform, β_{IT} genannt, hat ebenso wie IL-4R α_{IT} ein kurzes membranproximal gelegenes Stück der zytoplasmatischen Domäne von 23 Aminosäuren mit β_C gemeinsam, dann schließen sich, bedingt durch eine Verschiebung des Leserasters, 23 neue Aminosäuren an. Die verbliebene zytoplasmatische Domäne enthält das Box 1-Motiv als einzige definierte funktionelle Domäne. Transfektionsstudien mit dieser Variante zeigten, daß JAK2 zwar an den verbleibenden zytoplasmatischen Rest binden und auch phosphoryliert werden, ein mitogenes Signal durch β_{IT} jedoch nicht vermittelt werden kann.

Wendet man die Erkenntnisse aus diesen Untersuchungen an, um damit auf die Funktion des IL-4R α_{IT} zu schließen, legen sie nahe, daß diese Rezeptor-Variante vermutlich nicht fähig ist, Proliferation zu vermitteln. Mit vollständiger Sicherheit ließ sich das jedoch aus den oben erläuterten Gründen nicht vorhersagen. Ferner kam hinzu, daß eine eventuelle Funktion der neuen N-terminalen Domäne nicht abzuschätzen ist.

5.3 Funktion von IL-4R α_{IT}

Als geeignetes Zellsystem für die funktionellen Untersuchungen von IL-4R α_{IT} wurde die pro-B Zelllinie Ba/F3 der Maus gewählt und mit der cDNA des humanen IL-4R α und seiner Splice-Variante IL-4R α_{IT} transfiziert. Der IL-4R der Maus setzt sich wie der des Menschen aus der IL-4R α -Kette und der γ_C -Kette zusammen. Humanes IL-4 besitzt eine Spezifität für den humanen IL-4R α und kann nicht an die Mäuse-IL-4R α -Kette binden. Die humane IL-4R α Kette kann jedoch mit der γ_C der Maus einen funktionellen Rezeptorkomplex eingehen und bei Bindung von humanem IL-4 an diesen Rezeptorkomplex Signaltransduktion vermitteln. Dies beinhaltet, daß auch die involvierten Signalmoleküle der Maus an die hIL-4R α -Kette binden können. Mit diesem System ist es möglich, bei Stimulation der transfizierten Zellen mit hIL-4 die Wirkung über den transfizierten (humanen) Rezeptor allein zu betrachten. Durch

IL-4 vermittelte Effekte wie Proliferation, Schutz vor Apoptose und Differenzierung konnten in einem solchen System zwar nachgewiesen werden, es muß jedoch offenbleiben, ob alle signaltransduktorisches Mechanismen des hIL-4R α ebenso genutzt werden können wie in einem vergleichbaren humanen Zellsystem.

Die in der vorliegenden Arbeit durchgeführten Proliferationsstudien bestätigten die theoretischen Überlegungen zur Struktur und potentiellen Funktion von IL-4R α_{IT} . Die getesteten Zellklone, die mit der vollständigen IL-4R α -Kette transfiziert wurden, zeigten eine deutliche Proliferation, die das Wachstum unter mIL-4 in den meisten Fällen übertraf. Eine Proliferation der mit IL-4R α_{IT} transfizierten Zellen war dagegen in keinem der untersuchten Klone unter hIL-4 zu beobachten, während das Wachstum unter mIL-4 unbeeinträchtigt war. Bezieht man die oben gemachten Überlegungen über die Grenzen eines Mäuse-Zellsystems mit ein, ist nicht mit Sicherheit zu sagen, daß diese Untersuchungen die Vorgänge widerspiegeln, die in einem humanen Zellsystem ablaufen würden. Dennoch ist die Wahrscheinlichkeit groß, daß keine wesentliche Unterschiede bestehen.

In einer Untersuchung von Deutsch *et al.* mit Mutationskonstrukten des IL-4R α , die eine Punktmutation in der Homologie-Box 1 (P267S) aufwiesen, konnte gezeigt werden, daß gewisse Rezeptor-Mutanten zwar keine Proliferation der Zellen vermitteln, die Apoptose von Zellen dennoch verhindern können [58]. Dies bedeutet, daß die Proliferation der Zellen und der Schutz vor dem Zelltod durch Apoptose nicht miteinander gleichzusetzen sind und durch unterschiedliche Motive des IL-4R α vermittelt werden. Die von Deutsch *et al.* untersuchten Rezeptorkonstrukte, vermittelten aber allesamt keinen Schutz vor Apoptose, sofern ihnen die Glutaminsäure-reiche Region fehlte. Die mit IL-4R α_{IT} durchgeführten Funktionsstudien zeigten, daß IL-4R α_{IT} passend zum Fehlen der Glutaminsäure-reichen Region in der Rezeptor-Variante keinen Schutz vor Apoptose vermitteln kann, und bestätigten so die von Deutsch *et al.* gemachte Beobachtung.

5.4 Expression von IL-4R α_{IT} in Material von Patienten mit ALL

Bei der Untersuchung der Expression der Splice-Variante in zunächst nur einigen Proben von Patienten mit Erkrankung an einer ALL zeigten sich große quantitative Unterschiede der Expression von IL-4R α_{IT} in Relation zum vollständigen IL-4R α . Die Expression in den Proben variierte zwischen fehlendem Nachweis der Splice-Variante und Werten für die sAUC(IL-4R α_{IT}) von 80%. Da in verschiedenen Studien gezeigt wurde, daß IL-4 und damit auch die Expression des IL-4R eine Rolle bei Wachstum und immunologischer Abwehr von leukämischen Zellen spielen könnte, und da die zu diesem Zeitpunkt gemachten theoretischen Überlegungen auf eine geänderte Funktion des IL-4R α_{IT} hinwiesen, wurde eine

größere Gruppe von Patienten gezielt auf die Expression des IL-4R α_{IT} in einer kompetitiven RT-PCR quantitativ in Relation zum IL-4R α untersucht.

In der Auswertung zeigte sich, daß beim Vergleich der Proben von Patienten zur Zeit einer ALL-Ersterkrankung mit Proben von Rezidivpatienten in der Gruppe der Rezidivpatienten IL-4R α_{IT} in Relation zum IL-4R α , ausgedrückt als sAUC(IL-4R α_{IT}), signifikant stärker exprimiert wurde als in der Gruppe mit Ersterkrankungen (Abb. 21). Zwischen unterschiedlichen Materialien (Blut, KM) jeweils derselben Patienten und zwischen Proben von Patienten zum Zeitpunkt der Diagnose oder in Remission gab es keinen Unterschied (Abb. 20), so daß der Anteil an leukämischen Blasten in den Proben keinen Zusammenhang mit der Expression der Splice-Variante zu haben schien. Dies führte zunächst zu der Hypothese, daß es eine individuelle Disposition gäbe, einen bestimmten Anteil des IL-4R α_{IT} zu exprimieren. Daraus mußte dann gefolgert werden, daß die Patienten, die IL-4R α_{IT} im Rezidiv stark exprimierten, eine ähnlich starke Expression auch schon zum Zeitpunkt ihrer ALL-Ersterkrankung gezeigt haben müssen. Proben jeweils derselben Patienten zum Zeitpunkt der Ersterkrankung und des Rezidives zur Überprüfung dieser Annahme standen nicht zur Verfügung. Der sehr viel größere Anteil der Proben mit starker Expression von IL-4R α_{IT} in der Gruppe mit Rezidivpatienten sprach außerdem für eine Selektion dieser Patienten im Rezidiv, was den Schluß nahelegte, daß die Patienten, die IL-4R α_{IT} stark exprimierten, ein größeres Risiko haben, ein Rezidiv zu erleiden.

Hinzu kam zu diesem Zeitpunkt die Beobachtung, daß in den untersuchten Proben einer derzeit kleinen Gruppe von gesunden Probanden die sAUC(IL-4R α_{IT}) durchgehend niedrig war. Diese Gruppe von Probanden bestand ausschließlich aus Mitarbeitern unseres Labores, so daß das Material direkt nach der Abnahme aufgearbeitet wurde. Bei der Untersuchung weiterer gesunder Kontrollpersonen fiel eine stärkere Expression von IL-4R α_{IT} in den Fällen auf, in denen das abgenommene Blut aus organisatorischen Gründen nicht am selben Tag aufgearbeitet werden konnte. Versuche, in denen dies nachgestellt wurde, indem Blut eines Probanden zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach Abnahme aufgearbeitet wurde, bestätigten diese Beobachtung. Eine erneute Auswertung der Ergebnisse, zeigte die Abhängigkeit der IL-4R α_{IT} -Expression vom meist transportbedingten Zeitraum zwischen Abnahme und Aufarbeitung der Proben (Abb. 24).

Der hoch signifikante Unterschied der sAUC(IL-4R α_{IT}) zwischen Ersterkrankungen und Rezidiven, der zu der anfänglichen Fehlinterpretation der Ergebnisse geführt hatte, ließ sich nun dadurch erklären, daß die Patienten mit Ersterkrankung hauptsächlich an unserer Abteilung behandelt werden, während uns das Untersuchungsmaterial der Rezidivpatienten aus ganz Deutschland zukommt, was häufig längere Transportzeiten mit sich bringt. Diese

ungleiche Verteilung von Patienten mit Ersterkrankung und Rezidiv auf die unterschiedlichen Transportzeiten wird in der Abb. 39 im Streudiagramm deutlich.

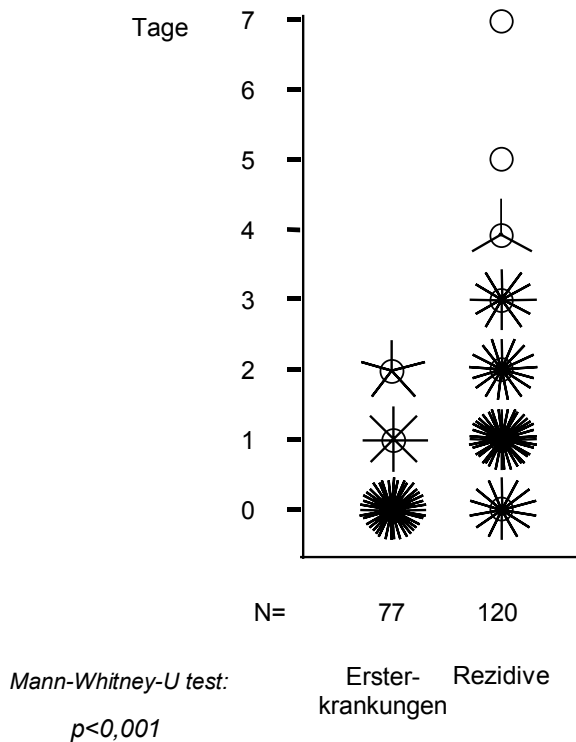


Abb. 39 Verteilung der Patienten mit Ersterkrankung oder Rezidiv auf die Transportzeit des Untersuchungsmaterials. Jeder Strich der „Sonnenblumen“ steht für eine ausgewertete Probe. An der Y-Achse ist die Transportzeit in Tagen aufgetragen.

5.5 Expression von IL-4R α_{IT} bei verzögerter Probenaufarbeitung

Die Faktoren, die die mRNA-Menge in einer Zelle beeinflussen können, sind zum einen die Generierung der mRNA durch Transkription und nachfolgendes Splicing der gemeinsamen pre-mRNA zu den reifen mRNA-Varianten und ihre Abbaurate. Hieraus ergeben sich auch die Mechanismen, die das Mengenverhältnis der beiden mRNA-Splice-Varianten bei verzögerter Probenaufarbeitung verändern könnten. Entweder durch die unterschiedliche Synthese der beiden mRNAs auf der Ebene des Splicing oder die unterschiedliche Degradation infolge ungleicher Stabilitäten.

5.5.1 mRNA-Degradation von IL-4R α und IL-4R α_{IT}

Unter Hemmung der Transkription mit einem geeigneten Zytostatikum ist es möglich, den Abbau der mRNA isoliert zu betrachten. Actinomycin D verhindert durch Interkalieren mit der DNA die Transkription und wird daher für solche mRNA-Stabilitäts-Tests häufig verwendet. Neuere Untersuchungen haben jedoch gezeigt, daß Actinomycin D einen direkten stabilisierenden Effekt auf die mRNA hat, wobei die zugrundeliegenden Mechanismen noch

nicht geklärt sind [128, 129, 130]. Obwohl dadurch die absolute mRNA-Halbwertszeit unter Actinomycin D verlängert ist, sollen dennoch die relativen Abbauraten der mRNAs erhalten bleiben [131], so daß diese Methode trotzdem dazu geeignet ist, nachzuweisen, ob die Veränderung des Verhältnisses der mRNA-Mengen von IL-4R α und IL-4R α_{IT} auf einer stärkeren Degradation der IL-4R α -mRNA beruht.

Auch unter Hemmung der Transkription kam es in den Proben, die verzögert nach Abnahme aufgearbeitet worden waren, zu einer Zunahme der sAUC(IL-4R α_{IT}). Unter der Voraussetzung, daß Actinomycin D, wie oben erwähnt, die mRNA zwar stabilisiert, die Relation der Halbwertszeiten unterschiedlicher mRNAs aber nicht beeinflußt, spricht dies für eine größere Stabilität der IL-4R α_{IT} -mRNA. Eine Mitbeteiligung von Abbauvorgängen an dem beobachteten Phänomen kann also nicht ausgeschlossen werden.

Obwohl sich die beiden mRNAs für IL-4R α und IL-4R α_{IT} bei einer Gesamtlänge von ca. 3500 nt innerhalb der kodierenden Sequenz nur um 50 nt voneinander unterscheiden, wäre ein Einfluß dieser geänderten Struktur auf die mRNA-Stabilität durchaus denkbar. Die Degradierung einer mRNA wird durch RNasen, Endo- sowie Exonukleasen, vermittelt. Bestimmte Sequenzen in der 3'-untranslatierten Region, der Poly-A-Trakt und sogenannte AU-reiche Elemente, aber auch Elemente innerhalb der kodierenden Sequenz beeinflussen die Stabilität einer mRNA. Durch Bindung an diese Sequenzen schützen mRNA-bindende Proteine die mRNA vor dem Angriff durch Endonukleasen. Dies beinhaltet, daß Veränderungen der primären Sequenz und/oder nachfolgende Änderungen der Sekundärstruktur den Abbau einer mRNA entscheidend beeinflussen können [132].

5.5.2 Zunahme der Expression von IL-4R α_{IT}

Die Zunahme der sAUC(IL-4R α_{IT}) bei verzögerter Probenaufarbeitung war in den Proben ohne Hemmung der Transkription jedoch deutlich stärker ausgeprägt als mit Transkriptionshemmung. Dies spricht dafür, daß ein zusätzlicher aktiver Prozeß im Sinne einer Verschiebung des Verhältnisses von IL-4R α und IL-4R α_{IT} in Richtung der Splice-Variante bei der Generierung der beiden mRNAs aus einer gemeinsamen pre-mRNA beteiligt ist. Ein weiteres Argument ist auch, daß sich der gleiche Effekt in unterschiedlich starker Ausprägung auch bei der Untersuchung der Expression der mRNAs von Splice-Varianten anderer Zytokine und Zytokin-Rezeptoren beobachten ließ, wie bei den Varianten von IL-7, IL-15, IL-7R, γ_C und β_C , so daß ein Zusammenhang mit dem eigentlichen Prozeß des alternativen Splicing wahrscheinlich ist.

An dieser Stelle soll noch einmal betont werden, daß in der Versuchsanordnung der kompetitiven RT-PCR nur das Mengenverhältnis der untersuchten mRNAs quantifiziert

werden kann. Die $sAUC(IL-4R\alpha_{IT})$ gibt also keinen absoluten Wert für die Expression der Splice-Variante wieder, sondern ist nur ein Maß für die Relation der Expression von $IL-4R\alpha$ und $IL-4R\alpha_{IT}$. Mit dieser Methode kann also nicht entschieden werden, ob ein höherer Wert für die $sAUC(IL-4R\alpha_{IT})$, wie bei den Materialien mit langer Transportzeit beobachtet wurde, auf einen Anstieg der Splice-Variante, auf einen Abfall des $IL-4R\alpha$ oder auf eine Kombination aus beidem zurückzuführen ist.

Die Untersuchung der einzelnen Transkripte mit jeweils spezifischen Primer-Paaren in einer semiquantitativen RT-PCR erlaubte eine Beurteilung des Expressionsunterschiedes der einzelnen Transkripte *zwischen* den Proben. Hierbei zeigte sich, daß die Zunahme der $sAUC(IL-4R\alpha_{IT})$ in den verzögert aufgearbeiteten Proben durch eine Hochregulation von $IL-4R\alpha_{IT}$ und eine Herunterregulation von $IL-4R\alpha$ bedingt ist. Wurden die Zellen, die sich in einem solchen Zustand befanden, wieder in Kultur genommen, war diese Situation innerhalb der kurzen Zeit von ca. 6 h wieder vollständig reversibel, die Expression von $IL-4R\alpha_{IT}$ nahm wieder ab, die Expression von $IL-4R\alpha$ dagegen wieder zu. Dieser Umstand deutet ebenfalls auf ein aktives Geschehen hin.

Gale *et al.* haben in ihrer Publikation über die Splice-Variante von β_C , genannt β_{IT} , ähnliche Beobachtungen gemacht [112], sie aber anders gedeutet. In deren Arbeit zeigte sich eine eher niedrige Expression von β_{IT} in den hämatopoietischen Zelllinien TF-1, HL60 und U937, ebenso in CD34-positiven Zellen und in Knochenmark und Granulozyten von gesunden Probanden. In Blasten von Patienten mit akuten Leukämien (ALL und AML) waren bei großer Variationsbreite allerdings Werte für den relativen Anteil der β_{IT} -mRNA bis >90% zu beobachten. Um zu untersuchen, ob ein Zusammenhang zwischen dem Differenzierungsgrad der Blasten und der Expression von β_{IT} besteht, wurden Blasten von Patienten mit AML in Kultur unter Stimulation mit IL-3, G-CSF und GM-CSF zur Differenzierung gebracht und morphologisch der Anteil differenzierter Zellen bestimmt. Die Beobachtung, daß die Expression von β_{IT} bei Kultivierung dieser Zellen abnahm und gleichzeitig der Anteil der differenzierten Zellen deutlich zunahm, veranlaßte die Autoren zu der Spekulation, daß ein Zusammenhang zwischen der Expression von β_{IT} und dem Differenzierungsgrad der Blasten bestünde. Eine Korrelation mit dem immunologisch erfaßbaren Differenzierungsgrad der AML-Blasten nach der FAB-Klassifikation konnte aber nicht beobachtet werden.

Es ist durchaus möglich, daß den in der oben zitierten Arbeit gemachten Beobachtungen dieselben Mechanismen zugrunde liegen, wie sie in der hier vorgestellten Arbeit beobachtet wurden, und so ebenfalls zu Fehlinterpretationen der Ergebnisse geführt haben. Über den Zeitraum zwischen Abnahme und Aufarbeitung der Proben sind in dieser Publikation keine

Angaben gemacht. In eigenen Versuchen wurde jedoch beobachtet, daß die relative Zunahme von β_{IT} bei verzögerter Probenaufarbeitung sogar noch stärker ausgeprägt ist als bei IL-4R α_{IT} (Abb. 27). Unter diesem Aspekt ist fraglich, ob in der Arbeit von Gale *et al.* wirklich ein Zusammenhang der β_{IT} -Expression mit der Differenzierung der Blasten besteht oder ob unabhängig davon die Herunterregulation von β_{IT} auch als „Erholung“ zu sehen ist. Die Expression von β_{IT} wurde nach einer Kulturzeit von 9-10 Tagen bestimmt, ein Zeitpunkt zu dem der größte Anteil der Blasten differenziert war. Angaben darüber, ob bereits zu einem früheren Zeitpunkt vor Differenzierung der Zellen, z.B. nach wenigen Stunden Kultur, die Expression von β_{IT} bestimmt wurde und wie die Expression zu diesem Zeitpunkt war, wurden in der Arbeit nicht gemacht.

Was für die Zunahme der Splice-Varianten von IL-4R α_{IT} , aber auch der Varianten von IL-7, IL-7R, IL-15, β_{IT} und γ_C verantwortlich ist, ist im Moment nicht zu klären. Wichtig dafür wäre zu wissen, welche Mechanismen in den Zellen in der Zeit zwischen Abnahme und Aufarbeitung ablaufen. Wahrscheinlich erfahren die Zellen in gewisser Weise eine Schädigung, die vielleicht in der ungenügenden Nährstoffzufuhr, dem Entzug beeinflussender Wachstumsfaktoren und/oder dem Anfall von Stoffwechselendprodukten und damit verbundenen Milieuänderungen begründet ist. Sicherlich würde ein Beibehalten dieses Zustandes zum Tod der Zellen, möglicherweise durch Apoptose, führen. Fest steht, daß, zumindest zu einem großen Anteil, ein aktiver Prozeß der Veränderung des Verhältnisses der Splice-Varianten zugrundeliegt. Anders ließe sich die Hochregulation von IL-4R α_{IT} nicht erklären.

Eine interessante Erklärung würde die Hoch- oder Herunterregulierung der Menge bzw. der Aktivität von Splicing-Faktoren darstellen. Es ist bekannt, daß während der Apoptose, im Rahmen von proteolytischen Prozessen, Splicing-Faktoren gespalten werden [133, 134]. Bisher ist nicht geklärt, ob dies auch Auswirkungen auf die Expression von Splice-Varianten in dieser Phase hat. Desweiteren stellt sich die Frage, ob in diesem Fall die Kaskade der proteolytischen Prozesse der Apoptose so weit fortgeschritten ist, daß sie irreversibel zum Tod der Zelle führt. Spekuliert man, daß solche Vorgänge ursächlich für die beobachteten Veränderungen sind, würde sich dies jedoch nicht mit der von uns gemachten Beobachtung vereinbaren lassen, daß IL-4R α_{IT} bei erneuter Kultivierung, also wahrscheinlich bei Wegfallen der Noxe, wieder herunterreguliert wird, in den Zellen also eine „Erholung“ stattfindet, die zeigt, daß es sich um ein zumindest bis zu einem bestimmten Punkt reversibles Geschehen handelt.

Der Apoptose-protective Faktor Bcl-x_L ist in zytoplasmatischen und nukleären Membranen lokalisiert und kann durch Erhalt der Homöostase der mitochondrialen Membran Apoptose verhindern. In mit Bcl-x_L transfizierten Zellen konnte nach Behandlung mit anti-Fas-

Antikörpern als Apoptose-induzierendem Stimulus zu einem großen Anteil die Apoptose der Zellen verhindert werden [135]. Da die Protease-Aktivität nach Stimulierung mit anti-Fas in den transfizierten Zellen im Vergleich zu den untransfizierten Kontroll-Zellen, die ausnahmslos apoptotisch wurden, nur unwesentlich verändert war, schien der protektive Mechanismus nicht in einer Hemmung der Protease-Aktivität zu liegen. Vielmehr zeigte sich ein Schutz der Zellen durch die Stabilisierung der mitochondrialen Membran in den transfizierten Zellen. In Gegenwart der anti-Fas Antikörper im Kulturmedium fand allerdings keine Proliferation der mit Bcl-x_L transfizierten Zellen statt. Nach Entfernung des Antikörpers war dies voll reversibel, während die untransfizierten Zellen unbeeinflusst auch nach Abwaschen des Antikörpers zu einem Zeitpunkt, an dem zwar schon Proteaseaktivität nachweisbar, das mitochondriale Membranpotential in den meisten Zellen aber noch erhalten war, in die Apoptose übergingen.

Diese Untersuchungen zeigen, daß nach Einwirken eines Apoptose-induzierenden Stimulus auch nach Auslösung der proteolytischen Kaskade die Vorgänge unter bestimmten Voraussetzungen vollständig reversibel sein können. Es stellt sich allerdings die Frage, ob vergleichbare Voraussetzungen auch *in vivo* denkbar wären und eine relevante Rolle spielen. Sicherlich kann nicht jeder die Zelle schädigende oder potentiell Apoptose auslösende Stimulus als Trigger eines „alles oder nichts“-Ereignisses angesehen werden, sondern es gibt vermutlich auch verschiedene langsam letale oder subletale Stimuli, aus denen die Zelle unbeschadet wieder hervorgehen kann. Es ist durchaus möglich, daß dabei zum Teil bzw. bis zu einem gewissen Punkt dieselben Mechanismen ablaufen wie bei der Apoptose.

Utz *et al.* [106] beschreiben, daß sich nach Auslösung von Apoptose über verschiedene Stimuli durch U1-snRNP-erkennende Antiseren vier Phosphoproteine präzipitieren lassen, die wahrscheinlich phosphorylierten SR-Proteinen entsprechen. Ob diese Proteine nach Auslösung der Apoptose phosphoryliert werden oder ob bereits phosphorylierte Proteine zum U1-snRNP-Komplex rekrutiert werden, läßt sich nicht mit Sicherheit beurteilen. Interessant ist jedoch, daß in einer weiteren Arbeit der Autoren in Lysaten apoptotischer Zellen eine phosphorylierte Serin/Threonin-Kinase gefunden wurde, die sich in nicht-apoptotischen Zellen nicht präzipitieren ließ [136]. Diese Beobachtungen suggerieren, daß regulatorische Mechanismen der Apoptose bzw. prä-apoptotischer Zustände unter anderem auf der Ebene des mRNA-Splicing stattfinden könnten. Experimentell konnte gezeigt werden, daß es von verschiedenen Apoptose-agonistischen Faktoren alternativ gespleißte Transkripte gibt, die Apoptose-protectiv wirken können. So werden Zellen, die die zur Familie der Bcl-2-Proteine gehörende größere Splice-Variante des *bcl-x*-Genes (Bcl-x_L) exprimieren, wie oben bereits erwähnt wurde, vor Apoptose geschützt, während die kleinere Splice-Variante Bcl-x_S die Empfindlichkeit der Zellen gegenüber apoptotischen Stimuli steigert [137]. Ähnliche Mechanismen sind für den *death domain*-Rezeptor LARD [138], das Genprodukt von *ced-4*, ein für

die Apoptose essentieller Faktor des Nematoden *Caenorhabditus elegans* [139], und für die Caspase 2 (Nedd2/Ich1) [140] bekannt. Es ist denkbar, daß alternatives Splicing in subletalen Zuständen einen kritischen Mechanismus darstellt, der evtl. zu der Entscheidung beiträgt, ob eine Zelle den endgültigen, irreversiblen Weg der Apoptose beschreitet. Die von uns beobachtete Hochregulation der Zytokin-/bzw. Zytokin-Rezeptor Splice-Varianten könnte dabei nur ein „Nebenprodukt“ dieses Mechanismus darstellen. Vielleicht kommt ihr aber auch eine eigene, in ihrer Funktion noch nicht geklärte, relevante Bedeutung zu.

5.5.3 Problem der verzögerten Probenaufarbeitung bei multizentrischen Studien

Die in der vorliegenden Arbeit durchgeführten Untersuchungen zeigen, daß die verzögerte Aufarbeitung von Untersuchungsmaterial zu signifikanten Veränderungen der relativen mRNA-Mengen dieser Proben geführt hat. Nachgewiesen wurde dies für die mRNA einiger Splice-Varianten von Zytokinen und Zytokinrezeptoren, es ist jedoch nicht ausgeschlossen, daß diverse andere mRNAs ebenfalls davon betroffen sind. In dieser Arbeit führte dies zu einem scheinbaren Zusammenhang mit Patienten-Kollektiven und so zunächst zu einer Fehlinterpretation der Ergebnisse. Der weitaus größte Teil der Untersuchungsmaterialien, die verspätet aufgearbeitet wurden, war aus anderen Kliniken zu uns gesandt worden, aus der eigenen Klinik konnten nur einzelne Proben aus organisatorischen Gründen nicht am selben Tag aufgearbeitet werden. Dies zeigt, daß das Problem vor allem in der Organisation des Transportes der Untersuchungsmaterialien liegt.

Es stellt sich die Frage, inwiefern bei großen multizentrischen Studien solche Verzögerungen infolge der weiten Transportwege zu vermeiden sind. Eine Kühlung der Proben während des Transportes würde die Situation vielleicht verbessern, stellt aber sicherlich trotzdem keine ideale Lösung dar. Das bestmögliche Vorgehen wäre zweifellos die Aufarbeitung des Untersuchungsmaterials vor Ort direkt nach Abnahme; dies ist aber schwerlich in die Praxis umzusetzen. Bis zu einer Lösung dieses Problemes muß sicherlich sehr genau überlegt werden, inwieweit mRNA-Quantifizierungen im Rahmen von solchen multizentrischen Studien überhaupt sinnvoll sind, wenn nicht ein Einfluß einer verzögerten Materialaufarbeitung auf die Expression der zu quantifizierenden mRNAs von vornherein ausgeschlossen worden ist .

6 ZUSAMMENFASSUNG

Die Untersuchung der Expression der mRNA der IL-4R alpha-Kette in Knochenmark und Blut von pädiatrischen Patienten mit akuter lymphoblastischer Leukämie mittels RT-PCR zeigte in unterschiedlichem Maße die zusätzliche Expression einer bislang noch nicht beschriebenen Splice-Variante der IL-4R α -mRNA, genannt IL-4R α_{IT} . Diese Variante unterscheidet sich durch das Fehlen eines einzelnen vollständigen Exons von 50 nt Länge, das 82 nt *downstream* des Bereiches gelegen ist, der für die Transmembranregion kodiert. Die Struktur eines aus dieser mRNA-Variante möglicherweise entstehenden Proteines entspricht einem membranständigen Rezeptor, dem im Vergleich zur vollständigen IL-4R α -Kette der größte Teil der zytoplasmatischen Region einschließlich der dort lokalisierten essentiellen signaltransduktorisches Domänen fehlt.

Zur Untersuchung der biologischen Funktion der Splice-Variante wurden Zellen der pro-B Zelllinie Ba/F3 der Maus mit IL-4R α_{IT} -cDNA transfiziert. Es zeigte sich, daß die Rezeptorvariante auf der Zelloberfläche exprimiert wird, bei Stimulation mit hIL-4 konnte jedoch keine Proliferation induziert und der Übergang der Zellen in die Apoptose nicht verhindert werden. Diese Beobachtungen stimmten mit den anhand der Struktur der Rezeptor-Variante gemachten theoretischen Überlegungen zur potentiellen Funktion überein.

Bei der Quantifizierung der Expression von IL-4R α_{IT} in Relation zum IL-4R α voller Länge mit einer kompetitiven RT-PCR an mononukleären Zellen einer größeren Gruppe von Kindern mit ALL zeigte sich zunächst ein irreführender Unterschied zwischen Proben von Kindern mit ALL-Ersterkrankung und Rezidiv, wobei die Splice-Variante in den Proben der Patienten mit ALL-Rezidiv signifikant stärker exprimiert wurde. Weitere Untersuchungen ergaben jedoch, daß der Zeitraum zwischen Abnahme und Aufarbeitung des Untersuchungsmaterials für diesen scheinbaren Zusammenhang verantwortlich war. Waren die Proben nicht direkt nach Abnahme, sondern verspätet aufgearbeitet worden, zeigten sie eine deutliche Verschiebung des Mengenverhältnisses der beiden mRNAs zugunsten der von IL-4R α_{IT} . Diese Beobachtung wurde experimentell an Proben gesunder Probanden wiederholt bestätigt. Die Untersuchung der mRNA-Stabilitäten unter Hemmung der Transkription mit Actinomycin D ließ einen Einfluß durch unterschiedliche Degradation der IL-4R α - und IL-4R α_{IT} -mRNAs zwar nicht ausschließen, dennoch ergaben die Versuche, daß zu einem großen Anteil aktive Expressionsänderungen der beiden Splice-Varianten im Sinne einer Regulation auf der Ebene des Splicing dafür verantwortlich zu sein scheinen. So zeigte sich das beobachtete Phänomen in unterschiedlicher Ausprägung auch bei der Untersuchung anderer Zytokine und Zytokin-Rezeptoren. Ferner war in den verzögert aufgearbeiteten Proben nicht nur eine Zunahme der *Relation* der IL-4R α_{IT} - zur IL-4R α -mRNA zu beobachten, sondern es zeigte

sich in einer semiquantitativen Bestimmung auch eine absolute Hochregulation von IL-4R α_{IT} im Vergleich zu den frisch aufgearbeiteten Proben. Wurden diese Zellen wieder in Kultur genommen, war dies innerhalb weniger Stunden wieder reversibel. Welche Änderungen der physiologischen Bedingungen in den Proben für die Zunahme der Expression der Splice-Variante verantwortlich sind, ist bisher nicht zu klären. Es ist jedoch vorstellbar, daß in den Proben Vorgänge ablaufen, die auch *in vivo* von Bedeutung sind.

Während der größte Teil der in dieser Arbeit untersuchten Patienten mit ALL-Ersterkrankung in Berlin behandelt wurde, kam uns das Untersuchungsmaterial der Rezidivpatienten im Rahmen der ALL-REZ BFM-Studie aus ganz Deutschland zu. Dies war für den Unterschied der Transportzeiten zwischen den beiden Gruppen verantwortlich und führte zu der anfänglichen Fehlinterpretation der Ergebnisse.

7 ABKÜRZUNGEN

γ_c	<i>Common gamma chain</i> , gemeinsame Gamma-Kette
β_c	<i>Common beta chain</i> , gemeinsame Beta-Kette
ALL	Akute lymphoblastische Leukämie
AML	Akute myeloische Leukämie
AS	Aminosäure(n)
AUC	<i>Area under the curve</i> , Fläche unter der Kurve
bp	Basenpaar(e)
EpoR	Erythropoietin-Rezeptor
GAPDH	Glycerinaldehyd-Phosphatdehydrogenase
IGF	<i>Insulin-like growth factor</i>
IL-4	Interleukin-4
IL-4R α	Interleukin-4 Rezeptor alpha
IL-4R α_{IT}	Interleukin-4 Rezeptor alpha <i>intracytoplasmic truncated</i>
JAK	Januskinase
KM	Knochenmark
nt	Nukleotid(e)
PB	Peripheres Blut
PBMC	<i>peripheral blood mononuclear cells</i> , mononukleäre Zellen peripheren Blutes
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i> , Polymerase-Ketten-Reaktion
RT-PCR	<i>Reverse transcription-polymerase chain reaction</i>
sAUC	<i>Standardized area under the curve</i> , standardisierte Fläche unter der Kurve
SSCP	<i>Single stranded conformational polymorphisms</i>
STAT	<i>Signal transducer and activator of transcription</i>
RPA	<i>RNase protection assay</i>
O.D.	Optische Dichte
G-CSF	<i>Granulocyte colony-stimulating factor</i>
GM-CSF	<i>Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor</i>
RNA	<i>Ribonucleic acid</i> , Ribonukleinsäure
mRNA	<i>messenger RNA</i>
snRNA	<i>small nuclear RNA</i>
DNA	<i>Desoxyribonucleic Acid</i> , Desoxyribonukleinsäure
SCF	<i>Stem cell factor</i> , Stammzell-Faktor
GHR	<i>Growth hormone receptor</i> , Wachstumshormon-Rezeptor

8 REFERENZEN

- [1] Howard, A.; Farrar, J.; Hilfiker, M.; Johnson, B.; Takatsu, K.; Hamaoka, T. und Paul, W. E. (1982): Identification of a T cell-derived B cell growth factor distinct from interleukin 2., J Exp Med (Band 155), Seite 914-924.
- [2] Yokota, T.; Otsuka, T.; Mosmann, T.; Banchereau, J.; DeFrance, T.; Blanchard, D.; De Vries, J. E.; Lee, F. und Arai, K. (1986): Isolation and characterization of a human interleukin cDNA clone, homologous to mouse B-cell stimulatory factor 1, that expresses B-cell- and T-cell-stimulating activities, Proc Natl Acad Sci U S A (Band 83), Nr. 16, Seite 5894-8.
- [3] Mitchell, L. C.; Davis, L. S. und Lipsky, P. E. (1989): Promotion of human T lymphocyte proliferation by IL-4, J Immunol (Band 142), Nr. 5, Seite 1548-57.
- [4] Toi, M.; Harris, A. L. und Bicknell, R. (1991): Interleukin-4 is a potent mitogen for capillary endothelium, Biochem Biophys Res Commun (Band 174), Nr. 3, Seite 1287-93.
- [5] Feghali, C. A.; Bost, K. L.; Boulware, D. W. und Levy, L. S. (1992): Human recombinant interleukin-4 induces proliferation and interleukin-6 production by cultured human skin fibroblasts, Clin Immunol Immunopathol (Band 63), Nr. 2, Seite 182-7.
- [6] Snapper, C. M.; Finkelman, F. D. und Paul, W. E. (1988): Regulation of IgG1 and IgE production by interleukin 4, Immunol Rev (Band 102), Seite 51-75.
- [7] Coffman, R. L.; Lebman, D. A. und Rothman, P. (1993): Mechanism and regulation of immunoglobulin isotype switching, Adv Immunol (Band 54), Seite 229-70.
- [8] Kuhn, R.; Rajewsky, K. und Muller, W. (1991): Generation and analysis of interleukin-4 deficient mice, Science (Band 254), Nr. 5032, Seite 707-10.
- [9] Conrad, D. H.; Keegan, A. D.; Kalli, K. R.; Van Dusen, R.; Rao, M. und Levine, A. D. (1988): Superinduction of low affinity IgE receptors on murine B lymphocytes by lipopolysaccharide and IL-4, J Immunol (Band 141), Nr. 4, Seite 1091-7.
- [10] Defrance, T.; Aubry, J. P.; Rousset, F.; Vanbervliet, B.; Bonnefoy, J. Y.; Arai, N.; Takebe, Y.; Yokota, T.; Lee, F.; Arai, K. und et al. (1987): Human recombinant interleukin 4 induces Fc epsilon receptors (CD23) on normal human B lymphocytes, J Exp Med (Band 165), Nr. 6, Seite 1459-67.
- [11] Noelle, R.; Krammer, P. H.; Ohara, J.; Uhr, J. W. und Vitetta, E. S. (1984): Increased expression of Ia antigens on resting B cells: an additional role for B-cell growth factor, Proc Natl Acad Sci U S A (Band 81), Nr. 19, Seite 6149-53.
- [12] Rousset, F.; Malefijt, R. W.; Slierendregt, B.; Aubry, J. P.; Bonnefoy, J. Y.; Defrance, T.; Banchereau, J. und de Vries, J. E. (1988): Regulation of Fc receptor for IgE

- (CD23) and class II MHC antigen expression on Burkitt's lymphoma cell lines by human IL-4 and IFN-gamma, *J Immunol* (Band 140), Nr. 8, Seite 2625-32.
- [13] Shields, J. G.; Armitage, R. J.; Jamieson, B. N.; Beverley, P. C. und Callard, R. E. (1989): Increased expression of surface IgM but not IgD or IgG on human B cells in response to IL-4, *Immunology* (Band 66), Nr. 2, Seite 224-7.
- [14] Maggi, E.; Parronchi, P.; Manetti, R.; Simonelli, C.; Piccinni, M. P.; Ruggi, F. S.; De Carli, M.; Ricci, M. und Romagnani, S. (1992): Reciprocal regulatory effects of IFN-gamma and IL-4 on the in vitro development of human Th1 and Th2 clones, *J Immunol* (Band 148), Nr. 7, Seite 2142-7.
- [15] Scott, P. (1991): IFN-gamma modulates the early development of Th1 and Th2 responses in a murine model of cutaneous leishmaniasis, *J Immunol* (Band 147), Nr. 9, Seite 3149-55.
- [16] Seder, R. A.; Boulay, J. L.; Finkelman, F.; Barbier, S.; Ben Sasson, S. Z.; Le Gros, G. und Paul, W. E. (1992): CD8⁺ T cells can be primed in vitro to produce IL-4, *J Immunol* (Band 148), Nr. 6, Seite 1652-6.
- [17] Mosmann, T. R.; Cherwinski, H.; Bond, M. W.; Giedlin, M. A. und Coffman, R. L. (1986): Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins, *J Immunol* (Band 136), Nr. 7, Seite 2348-57.
- [18] Romagnani, S. (1994): Lymphokine production by human T cells in disease states, *Annu Rev Immunol* (Band 12), Seite 227-57.
- [19] Mosmann, T. R. und Sad, S. (1996): The expanding universe of T-cell subsets: Th1, Th2 and more, *Immunol Today* (Band 17), Nr. 3, Seite 138-46.
- [20] Song, Z.; Casolaro, V.; Chen, R.; Georas, S. N.; Monos, D. und Ono, S. J. (1996): Polymorphic nucleotides within the human IL-4 promoter that mediate overexpression of the gene, *J Immunol* (Band 156), Nr. 2, Seite 424-9.
- [21] Hershey, G. K.; Friedrich, M. F.; Esswein, L. A.; Thomas, M. L. und Chatila, T. A. (1997): The association of atopy with a gain-of-function mutation in the alpha subunit of the interleukin-4 receptor, *N Engl J Med* (Band 337), Nr. 24, Seite 1720-5.
- [22] Mitsuyasu, H.; Izuhara, K.; Mao, X. Q.; Gao, P. S.; Arinobu, Y.; Enomoto, T.; Kawai, M.; Sasaki, S.; Dake, Y.; Hamasaki, N.; Shirakawa, T. und Hopkin, J. M. (1998): Ile50Val variant of IL4R alpha upregulates IgE synthesis and associates with atopic asthma, *Nat Genet* (Band 19), Nr. 2, Seite 119-20.
- [23] Akashi, K. (1993): The role of interleukin-4 in the negative regulation of leukemia cell growth, *Leuk Lymphoma* (Band 9), Nr. 3, Seite 205-9.
- [24] Okabe, M.; Kuni eda, Y.; Sugiura, T.; Tanaka, M.; Miyagishima, T.; Saiki, I.; Minagawa, T.; Kurosawa, M.; Itaya, T. und Miyazaki, T. (1991): Inhibitory effect of

- interleukin-4 on the in vitro growth of Ph1-positive acute lymphoblastic leukemia cells, *Blood* (Band 78), Nr. 6, Seite 1574-80.
- [25] Akashi, K.; Shibuya, T.; Harada, M.; Takamatsu, Y.; Uike, N.; Eto, T. und Niho, Y. (1991): Interleukin 4 suppresses the spontaneous growth of chronic myelomonocytic leukemia cells, *J Clin Invest* (Band 88), Nr. 1, Seite 223-30.
- [26] Yanagisawa, K.; Hatta, N.; Watanabe, I.; Horiuchi, T.; Hasegawa, H. und Fujita, S. (1995): IL-4 stimulates the growth of chronic myelomonocytic leukemia cells (CMMoL) once leukemic transformation has occurred, *Leukemia* (Band 9), Nr. 6, Seite 1056-9.
- [27] Jansen, J.H.; Fibbe, W.E.; Wientjens, G.J.; Willemze, R. und Kluin-Nelemans, J.C. (1993): Inhibitory effect of interleukin-4 on the proliferation of acute myeloid leukemia cells with myelo-monocytic differentiation (AML-M4/M5); the role of interleukin-6., *Leukemia* (Band 7), Nr. 643.
- [28] Spits, H.; Yssel, H.; Takebe, Y.; Arai, N.; Yokota, T.; Lee, F.; Arai, K.; Banchereau, J. und de Vries, J. E. (1987): Recombinant interleukin 4 promotes the growth of human T cells, *J Immunol* (Band 139), Nr. 4, Seite 1142-7.
- [29] Spits, H.; Yssel, H.; Paliard, X.; Kastelein, R.; Figdor, C. und de Vries, J. E. (1988): IL-4 inhibits IL-2-mediated induction of human lymphokine-activated killer cells, but not the generation of antigen-specific cytotoxic T lymphocytes in mixed leukocyte cultures, *J Immunol* (Band 141), Nr. 1, Seite 29-36.
- [30] Nagler, A.; Lanier, L. L. und Phillips, J. H. (1988): The effects of IL-4 on human natural killer cells. A potent regulator of IL-2 activation and proliferation, *J Immunol* (Band 141), Nr. 7, Seite 2349-51.
- [31] Kawakami, Y.; Custer, M. C.; Rosenberg, S. A. und Lotze, M. T. (1989): IL-4 regulates IL-2 induction of lymphokine-activated killer activity from human lymphocytes, *J Immunol* (Band 142), Nr. 10, Seite 3452-61.
- [32] Widmer, M. B.; Acres, R. B.; Sassenfeld, H. M. und Grabstein, K. H. (1987): Regulation of cytolytic cell populations from human peripheral blood by B cell stimulatory factor 1 (interleukin 4), *J Exp Med* (Band 166), Nr. 5, Seite 1447-55.
- [33] Kawakami, Y.; Rosenberg, S. A. und Lotze, M. T. (1988): Interleukin 4 promotes the growth of tumor-infiltrating lymphocytes cytotoxic for human autologous melanoma, *J Exp Med* (Band 168), Nr. 6, Seite 2183-91.
- [34] Fanslow, W. C.; Clifford, K.; VandenBos, T.; Teel, A.; Armitage, R. J. und Beckmann, M. P. (1990): A soluble form of the interleukin 4 receptor in biological fluids, *Cytokine* (Band 2), Nr. 6, Seite 398-401.
- [35] Golumbek, P. T.; Lazenby, A. J.; Levitsky, H. I.; Jaffee, L. M.; Karasuyama, H.; Baker, M. und Pardoll, D. M. (1991): Treatment of established renal cancer by tumor cells engineered to secrete interleukin-4, *Science* (Band 254), Nr. 5032, Seite 713-6.

-
- [36] Grusby, M. J.; Nabavi, N.; Wong, H.; Dick, R. F.; Bluestone, J. A.; Schotz, M. C. und Glimcher, L. H. (1990): Cloning of an interleukin-4 inducible gene from cytotoxic T lymphocytes and its identification as a lipase, *Cell* (Band 60), Nr. 3, Seite 451-9.
- [37] Russell, S. M.; Keegan, A. D.; Harada, N.; Nakamura, Y.; Noguchi, M.; Leland, P.; Friedmann, M. C.; Miyajima, A.; Puri, R. K. und Paul, W. E. (1993): Interleukin-2 receptor gamma chain: a functional component of the interleukin-4 receptor, *Science* (Band 262), Nr. 5141, Seite 1880-3.
- [38] Kondo, M.; Takeshita, T.; Ishii, N.; Nakamura, M.; Watanabe, S.; Arai, K. und Sugamura, K. (1993): Sharing of the interleukin-2 (IL-2) receptor gamma chain between receptors for IL-2 and IL-4, *Science* (Band 262), Nr. 5141, Seite 1874-7.
- [39] Aman, M. J.; Tayebi, N.; Obiri, N. I.; Puri, R. K.; Modi, W. S. und Leonard, W. J. (1996): cDNA cloning and characterization of the human interleukin 13 receptor alpha chain, *J Biol Chem* (Band 271), Nr. 46, Seite 29265-29270.
- [40] Miloux, B.; Laurent, P.; Bonnin, O.; Lupker, J.; Caput, D.; Vita, N. und Ferrara, P. (1997): Cloning of the human IL-13R alpha1 chain and reconstitution with the IL4R alpha of a functional IL-4/IL-13 receptor complex, *FEBS Lett* (Band 401), Nr. 2-3, Seite 163-6.
- [41] Caput, D.; Laurent, P.; Kaghad, M.; Lelias, J. M.; Lefort, S.; Vita, N. und Ferrara, P. (1996): Cloning and characterization of a specific interleukin (IL)-13 binding protein structurally related to the IL-5 receptor alpha chain, *J Biol Chem* (Band 271), Nr. 28, Seite 16921-6.
- [42] Park, L. S.; Friend, D.; Sassenfeld, H. M. und Urdal, D. L. (1987): Characterization of the human B cell stimulatory factor 1 receptor, *J Exp Med* (Band 166), Nr. 2, Seite 476-88.
- [43] Bazan, J. F. (1990): Structural design and molecular evolution of a cytokine receptor superfamily, *Proc Natl Acad Sci U S A* (Band 87), Nr. 18, Seite 6934-8.
- [44] Miyazaki, T.; Maruyama, M.; Yamada, G.; Hatakeyama, M. und Taniguchi, T. (1991): The integrity of the conserved 'WS motif' common to IL-2 and other cytokine receptors is essential for ligand binding and signal transduction, *Embo J* (Band 10), Nr. 11, Seite 3191-7.
- [45] Yin, T.; Tsang, M. L. und Yang, Y. C. (1994): JAK1 kinase forms complexes with interleukin-4 receptor and 4PS/insulin receptor substrate-1-like protein and is activated by interleukin-4 and interleukin-9 in T lymphocytes, *J Biol Chem* (Band 269), Nr. 43, Seite 26614-7.
- [46] Miyazaki, T.; Kawahara, A.; Fujii, H.; Nakagawa, Y.; Minami, Y.; Liu, Z. J.; Oishi, I.; Silvennoinen, O.; Witthuhn, B. A.; Ihle, J. N. und et al. (1994): Functional activation of

- Jak1 and Jak3 by selective association with IL-2 receptor subunits, *Science* (Band 266), Nr. 5187, Seite 1045-7.
- [47] Ihle, J. N. und Kerr, I. M. (1995): Jaks and Stats in signaling by the cytokine receptor superfamily, *Trends Genet* (Band 11), Nr. 2, Seite 69-74.
- [48] Keegan, A. D.; Nelms, K.; White, M.; Wang, L. M.; Pierce, J. H. und Paul, W. E. (1994): An IL-4 receptor region containing an insulin receptor motif is important for IL-4-mediated IRS-1 phosphorylation and cell growth, *Cell* (Band 76), Nr. 5, Seite 811-20.
- [49] Sun, X. J.; Wang, L. M.; Zhang, Y.; Yenush, L.; Myers, M. G., Jr.; Glasheen, E.; Lane, W. S.; Pierce, J. H. und White, M. F. (1995): Role of IRS-2 in insulin and cytokine signalling, *Nature* (Band 377), Nr. 6545, Seite 173-7.
- [50] O'Neill, T.J.; Craparo, A. und Gustafson, T. A. (1994): Characterization of an interaction between insulin receptor substrate 1 and the insulin receptor by using the two-hybrid system, *Mol Cell Biol* (Band 14), Nr. 10, Seite 6433-42.
- [51] Wang, L. M.; Myers, M. G., Jr.; Sun, X. J.; Aaronson, S. A.; White, M. und Pierce, J. H. (1993): IRS-1: essential for insulin- and IL-4-stimulated mitogenesis in hematopoietic cells, *Science* (Band 261), Nr. 5128, Seite 1591-4.
- [52] Hou, J.; Schindler, U.; Henzel, W. J.; Ho, T. C.; Brasseur, M. und McKnight, S. L. (1994): An interleukin-4-induced transcription factor: IL-4 Stat, *Science* (Band 265), Nr. 5179, Seite 1701-6.
- [53] Kotanides, H. und Reich, N. C. (1993): Requirement of tyrosine phosphorylation for rapid activation of a DNA binding factor by IL-4, *Science* (Band 262), Nr. 5137, Seite 1265-7.
- [54] Kotanides, H. und Reich, N. C. (1996): Interleukin-4-induced STAT6 recognizes and activates a target site in the promoter of the interleukin-4 receptor gene, *J Biol Chem* (Band 271), Nr. 41, Seite 25555-61.
- [55] Schindler, C.; Kashleva, H.; Pernis, A.; Pine, R. und Rothman, P. (1994): STF-IL-4: a novel IL-4-induced signal transducing factor, *Embo J* (Band 13), Nr. 6, Seite 1350-6.
- [56] Takeda, K.; Tanaka, T.; Shi, W.; Matsumoto, M.; Minami, M.; Kashiwamura, S.; Nakanishi, K.; Yoshida, N.; Kishimoto, T. und Akira, S. (1996): Essential role of Stat6 in IL-4 signalling, *Nature* (Band 380), Nr. 6575, Seite 627-30.
- [57] Ryan, J. J.; McReynolds, L. J.; Keegan, A.; Wang, L. H.; Garfein, E.; Rothman, P.; Nelms, K. und Paul, W. E. (1996): Growth and gene expression are predominantly controlled by distinct regions of the human IL-4 receptor, *Immunity* (Band 4), Nr. 2, Seite 123-32.

-
- [58] Deutsch, H. H.; Koettnitz, K.; Chung, J. und Kalthoff, F. S. (1995): Distinct sequence motifs within the cytoplasmic domain of the human IL-4 receptor differentially regulate apoptosis inhibition and cell growth, *J Immunol* (Band 154), Nr. 8, Seite 3696-703.
- [59] Pernis, A.; Witthuhn, B.; Keegan, A. D.; Nelms, K.; Garfein, E.; Ihle, J. N.; Paul, W. E.; Pierce, J. H. und Rothman, P. (1995): Interleukin 4 signals through two related pathways, *Proc Natl Acad Sci U S A* (Band 92), Nr. 17, Seite 7971-5.
- [60] Zamorano, J. und Keegan, A. D. (1998): Regulation of apoptosis by tyrosine-containing domains of IL-4R alpha: Y497 and Y713, but not the STAT6-docking tyrosines, signal protection from apoptosis, *J Immunol* (Band 161), Nr. 2, Seite 859-67.
- [61] Harada, N.; Yang, G.; Miyajima, A. und Howard, M. (1992): Identification of an essential region for growth signal transduction in the cytoplasmic domain of the human interleukin-4 receptor, *J Biol Chem* (Band 267), Nr. 32, Seite 22752-8.
- [62] Seldin, D. C. und Leder, P. (1994): Mutational analysis of a critical signaling domain of the human interleukin 4 receptor, *Proc Natl Acad Sci U S A* (Band 91), Nr. 6, Seite 2140-4.
- [63] Harada, N.; Higuchi, K.; Wakao, H.; Hamasaki, N. und Izuhara, K. (1998): Identification of the critical portions of the human IL-4 receptor alpha chain for activation of STAT6, *Biochem Biophys Res Commun* (Band 246), Nr. 3, Seite 675-80.
- [64] Mikita, T.; Campbell, D.; Wu, P. G.; Williamson, K. und Schindler, U. (1996): Requirements for interleukin-4-induced gene expression and functional characterization of Stat6, *Mol Cell Biol* (Band 16), Nr. 10, Seite 5811-20.
- [65] Moriggl, R.; Erhardt, I.; Kammer, W.; Berchtold, S.; Schnarr, B.; Lischke, A.; Groner, B. und Friedrich, K. (1998): Activation of STAT6 is not dependent on phosphotyrosine-mediated docking to the interleukin-4 receptor and can be blocked by dominant-negative mutants of both receptor subunits, *Eur J Biochem* (Band 251), Nr. 1-2, Seite 25-35.
- [66] Lewis, B. (1996): Nuclear splicing, Lewis, B., *Genes* Seite 885-920.
- [67] Zahler, A. M.; Lane, W. S.; Stolk, J. A. und Roth, M. B. (1992): SR proteins: a conserved family of pre-mRNA splicing factors, *Genes Dev* (Band 6), Nr. 5, Seite 837-47.
- [68] Cavalc, Y.; Popielarz, M.; Fuchs, J. P.; Gattoni, R. und Stevenin, J. (1994): Characterization and cloning of the human splicing factor 9G8: a novel 35 kDa factor of the serine/arginine protein family, *Embo J* (Band 13), Nr. 11, Seite 2639-49.
- [69] Sreaton, G. R.; Caceres, J. F.; Mayeda, A.; Bell, M. V.; Plebanski, M.; Jackson, D. G.; Bell, J. I. und Krainer, A. R. (1995): Identification and characterization of three

- members of the human SR family of pre-mRNA splicing factors, *Embo J* (Band 14), Nr. 17, Seite 4336-49.
- [70] Chaudhary, N.; McMahon, C. und Blobel, G. (1991): Primary structure of a human arginine-rich nuclear protein that colocalizes with spliceosome components, *Proc Natl Acad Sci U S A* (Band 88), Nr. 18, Seite 8189-93.
- [71] Ge, H.; Zuo, P. und Manley, J. L. (1991): Primary structure of the human splicing factor ASF reveals similarities with *Drosophila* regulators, *Cell* (Band 66), Nr. 2, Seite 373-82.
- [72] Fu, X. D. und Maniatis, T. (1992): Isolation of a complementary DNA that encodes the mammalian splicing factor SC35, *Science* (Band 256), Nr. 5056, Seite 535-8.
- [73] Krainer, A. R.; Conway, G. C. und Kozak, D. (1990): Purification and characterization of pre-mRNA splicing factor SF2 from HeLa cells, *Genes Dev* (Band 4), Nr. 7, Seite 1158-71.
- [74] Fu, X. D. (1995): The superfamily of arginine/serine-rich splicing factors, *RNA* (Band 1), Nr. 7, Seite 663-80.
- [75] Valcarcel, J.; Gaur, R. K.; Singh, R. und Green, M. R. (1996): Interaction of U2AF65 RS region with pre-mRNA branch point and promotion of base pairing with U2 snRNA [corrected] [published erratum appears in *Science* 1996 Oct 4;274(5284):21], *Science* (Band 273), Nr. 5282, Seite 1706-9.
- [76] Zamore, P. D.; Patton, J. G. und Green, M. R. (1992): Cloning and domain structure of the mammalian splicing factor U2AF, *Nature* (Band 355), Nr. 6361, Seite 609-14.
- [77] Newman, A. J. (1997): The role of U5 snRNP in pre-mRNA splicing, *Embo J* (Band 16), Nr. 19, Seite 5797-800.
- [78] Staknis, D. und Reed, R. (1994): SR proteins promote the first specific recognition of Pre-mRNA and are present together with the U1 small nuclear ribonucleoprotein particle in a general splicing enhancer complex, *Mol Cell Biol* (Band 14), Nr. 11, Seite 7670-82.
- [79] Kohtz, J. D.; Jamison, S. F.; Will, C. L.; Zuo, P.; Luhrmann, R.; Garcia Blanco, M. A. und Manley, J. L. (1994): Protein-protein interactions and 5'-splice-site recognition in mammalian mRNA precursors, *Nature* (Band 368), Nr. 6467, Seite 119-24.
- [80] Wu, J. Y. und Maniatis, T. (1993): Specific interactions between proteins implicated in splice site selection and regulated alternative splicing, *Cell* (Band 75), Nr. 6, Seite 1061-70.
- [81] Zuo, P. und Maniatis, T. (1996): The splicing factor U2AF35 mediates critical protein-protein interactions in constitutive and enhancer-dependent splicing, *Genes Dev* (Band 10), Nr. 11, Seite 1356-68.

-
- [82] Champion-Arnaud, P. und Reed, R. (1994): The prespliceosome components SAP 49 and SAP 145 interact in a complex implicated in tethering U2 snRNP to the branch site, *Genes Dev* (Band 8), Nr. 16, Seite 1974-83.
- [83] Gozani, O.; Feld, R. und Reed, R. (1996): Evidence that sequence-independent binding of highly conserved U2 snRNP proteins upstream of the branch site is required for assembly of spliceosomal complex A, *Genes Dev* (Band 10), Nr. 2, Seite 233-43.
- [84] Madhani, H. D. und Guthrie, C. (1992): A novel base-pairing interaction between U2 and U6 snRNAs suggests a mechanism for the catalytic activation of the spliceosome, *Cell* (Band 71), Nr. 5, Seite 803-17.
- [85] Manley, J. L. und Tacke, R. (1996): SR proteins and splicing control, *Genes Dev* (Band 10), Nr. 13, Seite 1569-79.
- [86] Krainer, A. R.; Conway, G. C. und Kozak, D. (1990): The essential pre-mRNA splicing factor SF2 influences 5' splice site selection by activating proximal sites, *Cell* (Band 62), Nr. 1, Seite 35-42.
- [87] Caceres, J. F.; Stamm, S.; Helfman, D. M. und Krainer, A. R. (1994): Regulation of alternative splicing in vivo by overexpression of antagonistic splicing factors, *Science* (Band 265), Nr. 5179, Seite 1706-9.
- [88] Adams, M. D.; Rudner, D. Z. und Rio, D. C. (1996): Biochemistry and regulation of pre-mRNA splicing, *Curr Opin Cell Biol* (Band 8), Nr. 3, Seite 331-9.
- [89] Tanaka, K.; Watakabe, A. und Shimura, Y. (1994): Polypurine sequences within a downstream exon function as a splicing enhancer, *Mol Cell Biol* (Band 14), Nr. 2, Seite 1347-54.
- [90] Wang, Z.; Hoffmann, H. M. und Grabowski, P. J. (1995): Intrinsic U2AF binding is modulated by exon enhancer signals in parallel with changes in splicing activity, *RNA* (Band 1), Nr. 1, Seite 21-35.
- [91] Lavigne, A.; La Branche, H.; Kornblihtt, A. R. und Chabot, B. (1993): A splicing enhancer in the human fibronectin alternate ED1 exon interacts with SR proteins and stimulates U2 snRNP binding, *Genes Dev* (Band 7), Nr. 12A, Seite 2405-17.
- [92] Watakabe, A.; Tanaka, K. und Shimura, Y. (1993): The role of exon sequences in splice site selection, *Genes Dev* (Band 7), Nr. 3, Seite 407-18.
- [93] Sun, Q.; Mayeda, A.; Hampson, R. K.; Krainer, A. R. und Rottman, F. M. (1993): General splicing factor SF2/ASF promotes alternative splicing by binding to an exonic splicing enhancer, *Genes Dev* (Band 7), Nr. 12B, Seite 2598-608.
- [94] Woppmann, A.; Will, C. L.; Kornstadt, U.; Zuo, P.; Manley, J. L. und Luhrmann, R. (1993): Identification of an snRNP-associated kinase activity that phosphorylates

- arginine/serine rich domains typical of splicing factors, *Nucleic Acids Res* (Band 21), Nr. 12, Seite 2815-22.
- [95] Mermoud, J. E.; Cohen, P. T. und Lamond, A. I. (1994): Regulation of mammalian spliceosome assembly by a protein phosphorylation mechanism, *Embo J* (Band 13), Nr. 23, Seite 5679-88.
- [96] Mermoud, J. E.; Cohen, P. und Lamond, A. I. (1992): Ser/Thr-specific protein phosphatases are required for both catalytic steps of pre-mRNA splicing, *Nucleic Acids Res* (Band 20), Nr. 20, Seite 5263-9.
- [97] Gui, J. F.; Lane, W. S. und Fu, X. D. (1994): A serine kinase regulates intracellular localization of splicing factors in the cell cycle, *Nature* (Band 369), Nr. 6482, Seite 678-82.
- [98] Gui, J. F.; Tronchere, H.; Chandler, S. D. und Fu, X. D. (1994): Purification and characterization of a kinase specific for the serine- and arginine-rich pre-mRNA splicing factors, *Proc Natl Acad Sci U S A* (Band 91), Nr. 23, Seite 10824-8.
- [99] Wang, H. Y.; Lin, W.; Dyck, J. A.; Yeakley, J. M.; Songyang, Z.; Cantley, L. C. und Fu, X. D. (1998): SRPK2: a differentially expressed SR protein-specific kinase involved in mediating the interaction and localization of pre-mRNA splicing factors in mammalian cells, *J Cell Biol* (Band 140), Nr. 4, Seite 737-50.
- [100] Colwill, K.; Feng, L. L.; Yeakley, J. M.; Gish, G. D.; Caceres, J. F.; Pawson, T. und Fu, X. D. (1996): SRPK1 and Clk/Sty protein kinases show distinct substrate specificities for serine/arginine-rich splicing factors, *J Biol Chem* (Band 271), Nr. 40, Seite 24569-75.
- [101] Melcher, M. L. und Thorner, J. (1996): Identification and characterization of the CLK1 gene product, a novel CaM kinase-like protein kinase from the yeast *Saccharomyces cerevisiae*, *J Biol Chem* (Band 271), Nr. 47, Seite 29958-68.
- [102] Eperon, I. C.; Ireland, D. C.; Smith, R. A.; Mayeda, A. und Krainer, A. R. (1993): Pathways for selection of 5' splice sites by U1 snRNPs and SF2/ASF, *Embo J* (Band 12), Nr. 9, Seite 3607-17.
- [103] Zahler, A. M.; Neugebauer, K. M.; Lane, W. S. und Roth, M. B. (1993): Distinct functions of SR proteins in alternative pre-mRNA splicing, *Science* (Band 260), Nr. 5105, Seite 219-22.
- [104] Zahler, A. M. und Roth, M. B. (1995): Distinct functions of SR proteins in recruitment of U1 small nuclear ribonucleoprotein to alternative 5' splice sites, *Proc Natl Acad Sci U S A* (Band 92), Nr. 7, Seite 2642-6.
- [105] Lin, C. H. und Patton, J. G. (1995): Regulation of alternative 3' splice site selection by constitutive splicing factors, *RNA* (Band 1), Nr. 3, Seite 234-45.

-
- [106] Utz, P. J.; Hottelet, M.; van Venrooij, W. J. und Anderson, P. (1998): Association of phosphorylated serine/arginine (SR) splicing factors with the U1-small ribonucleoprotein (snRNP) autoantigen complex accompanies apoptotic cell death, *J Exp Med* (Band 187), Nr. 4, Seite 547-60.
- [107] Smith, C. W.; Patton, J. G. und Nadal Ginard, B. (1989): Alternative splicing in the control of gene expression, *Annu Rev Genet* (Band 23), Seite 527-77.
- [108] Raines, M. A.; Liu, L.; Quan, S. G.; Joe, V.; DiPersio, J. F. und Golde, D. W. (1991): Identification and molecular cloning of a soluble human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor receptor, *Proc-Natl-Acad-Sci-U-S-A* (Band 88), Nr. 18, Seite 8203-7.
- [109] Pleiman, C. M.; Gimpel, S. D.; Park, L. S.; Harada, H.; Taniguchi, T. und Ziegler, S. F. (1991): Organization of the murine and human interleukin-7 receptor genes: two mRNAs generated by differential splicing and presence of a type I-interferon-inducible promoter, *Mol Cell Biol* (Band 11), Nr. 6, Seite 3052-9.
- [110] Horiuchi, S.; Koyanagi, Y.; Zhou, Y.; Miyamoto, H.; Tanaka, Y.; Waki, M.; Matsumoto, A.; Yamamoto, M. und Yamamoto, N. (1994): Soluble interleukin-6 receptors released from T cell or granulocyte/macrophage cell lines and human peripheral blood mononuclear cells are generated through an alternative splicing mechanism, *Eur J Immunol* (Band 24), Nr. 8, Seite 1945-8.
- [111] Ross, R. J.; Esposito, N.; Shen, X. Y.; Von Laue, S.; Chew, S. L.; Dobson, P. R.; Postel Vinay, M. C. und Finidori, J. (1997): A short isoform of the human growth hormone receptor functions as a dominant negative inhibitor of the full-length receptor and generates large amounts of binding protein, *Mol Endocrinol* (Band 11), Nr. 3, Seite 265-73.
- [112] Gale, R. E.; Freeburn, R. W.; Khwaja, A.; Chopra, R. und Linch, D. C. (1998): A truncated isoform of the human beta chain common to the receptors for granulocyte-macrophage colony-stimulating factor, interleukin-3 (IL-3), and IL-5 with increased mRNA expression in some patients with acute leukemia, *Blood* (Band 91), Nr. 1, Seite 54-63.
- [113] Tuypens, T.; Plaetinck, G.; Baker, E.; Sutherland, G.; Brusselle, G.; Fiers, W.; Devos, R. und Tavernier, J. (1992): Organization and chromosomal localization of the human interleukin 5 receptor alpha-chain gene, *Eur Cytokine Netw* (Band 3), Nr. 5, Seite 451-9.
- [114] Mosley, B.; Beckmann, M. P.; March, C. J.; Idzerda, R. L.; Gimpel, S. D.; VandenBos, T.; Friend, D.; Alpert, A.; Anderson, D. und Jackson, J. (1989): The murine interleukin-4 receptor: molecular cloning and characterization of secreted and membrane bound forms, *Cell* (Band 59), Nr. 2, Seite 335-48.

-
- [115] Nakamura, Y.; Komatsu, N. und Nakauchi, H. (1992): A truncated erythropoietin receptor that fails to prevent programmed cell death of erythroid cells, *Science* (Band 257), Nr. 5073, Seite 1138-41.
- [116] Vandenbark, G. R.; deCastro, C. M.; Taylor, H.; Dew Knight, S. und Kaufman, R. E. (1992): Cloning and structural analysis of the human c-kit gene, *Oncogene* (Band 7), Nr. 7, Seite 1259-66.
- [117] Wypych, J.; Bennett, L. G.; Schwartz, M. G.; Clogston, C. L.; Lu, H. S.; Broudy, V. C.; Bartley, T. D.; Parker, V. P. und Langley, K. E. (1995): Soluble kit receptor in human serum, *Blood* (Band 85), Nr. 1, Seite 66-73.
- [118] Heaney, M. L. und Golde, D. W. (1996): Soluble cytokine receptors, *Blood* (Band 87), Nr. 3, Seite 847-57.
- [119] Budel, L. M.; Dong, F.; Lowenberg, B. und Touw, I. P. (1995): Hematopoietic growth factor receptors: structure variations and alternatives of receptor complex formation in normal hematopoiesis and in hematopoietic disorders, *Leukemia* (Band 9), Nr. 4, Seite 553-61.
- [120] Crosier, K. E.; Hall, L. R.; Vitas, M. R. und Crosier, P. S. (1997): Expression and functional analysis of two isoforms of the human GM-CSF receptor alpha chain in myeloid development and leukaemia, *Br J Haematol* (Band 98), Nr. 3, Seite 540-8.
- [121] Heaney, M. L.; Vera, J. C.; Raines, M. A. und Golde, D. W. (1995): Membrane-associated and soluble granulocyte/macrophage-colony-stimulating factor receptor alpha subunits are independently regulated in HL-60 cells, *Proc Natl Acad Sci U S A* (Band 92), Nr. 6, Seite 2365-9.
- [122] Platzter, C.; Ode Hakim, S.; Reinke, P.; Docke, W. D.; Ewert, R. und Volk, H. D. (1994): Quantitative PCR analysis of cytokine transcription patterns in peripheral mononuclear cells after anti-CD3 rejection therapy using two novel multispecific competitor fragments, *Transplantation* (Band 58), Nr. 2, Seite 264-8.
- [123] Kebelmann-Betzing, C.; Seeger, K.; Dragon, S.; Schmitt, G.; Möricke, A.; Schild, T. A.; Henze, G. und Beyermann, B. (1998): Advantages of a new Taq DNA polymerase in multiplex PCR and time-release PCR, *Biotechniques* (Band 24 (1)), Seite 154-158.
- [124] Idzerda, R. L.; March, C. J.; Mosley, B.; Lyman, S. D.; Vanden Bos, T.; Gimpel, S. D.; Din, W. S.; Grabstein, K. H.; Widmer, M. B. und Park, L. S. (1990): Human interleukin 4 receptor confers biological responsiveness and defines a novel receptor superfamily, *J Exp Med* (Band 171), Nr. 3, Seite 861-73.
- [125] Wrighton, N.; Campbell, L. A.; Harada, N.; Miyajima, A. und Lee, F. (1992): The murine interleukin-4 receptor gene: genomic structure, expression and potential for alternative splicing, *Growth Factors* (Band 6), Nr. 2, Seite 103-18.

-
- [126] Enssle, K.; Enders, B.; Kurrle, R.; Lauffer, L.; Schorlemmer, H. U.; Dickneite, G.; Kanzy, E. J. und Seiler, F. R. (1995): Biology of natural and recombinant soluble interleukin-4 receptor, *Behring Inst Mitt* (Band 96), Seite 103-17.
 - [127] Malabarba, M. G.; Kirken, R. A.; Rui, H.; Koettnitz, K.; Kawamura, M.; JJ, O. Shea; Kalthoff, F. S. und Farrar, W. L. (1995): Activation of JAK3, but not JAK1, is critical to interleukin-4 (IL4) stimulated proliferation and requires a membrane-proximal region of IL4 receptor alpha, *J Biol Chem* (Band 270), Nr. 16, Seite 9630-7.
 - [128] Chen, C. Y.; Xu, N. und Shyu, A. B. (1995): mRNA decay mediated by two distinct Au-rich elements from c-fos and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor transcripts: different deadenylation kinetics and uncoupling from translation, *Mol Cell Biol* (Band 15), Nr. 10, Seite 5777-88.
 - [129] Goldberg, M. A.; Gaut, C. C. und Bunn, H. F. (1991): Erythropoietin mRNA levels are governed by both the rate of gene transcription and posttranscriptional events, *Blood* (Band 77), Nr. 2, Seite 271-7 *LHM: Bestand in der Charit, -> siehe Zeitschriftenkatalog!
 - [130] Seiser, C.; Posch, M.; Thompson, N. und Kuhn, L. C. (1995): Effect of transcription inhibitors on the iron-dependent degradation of transferrin receptor mRNA, *J Biol Chem* (Band 270), Nr. 49, Seite 29400-6.
 - [131] Rajagopalan, L. E. und Malter, J. S. (1997): Regulation of eukaryotic messenger RNA turnover, *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol* (Band 56), Seite 257-86.
 - [132] Ross, J. (1996): Control of messenger RNA stability in higher eukaryotes, *Trends Genet* (Band 12), Nr. 5, Seite 171-5.
 - [133] Waterhouse, N.; Kumar, S.; Song, Q.; Strike, P.; Sparrow, L.; Dreyfuss, G.; Alnemri, E. S.; Litwack, G.; Lavin, M. und Watters, D. (1996): Heteronuclear ribonucleoproteins C1 and C2, components of the spliceosome, are specific targets of interleukin 1beta-converting enzyme-like proteases in apoptosis, *J Biol Chem* (Band 271), Nr. 46, Seite 29335-41.
 - [134] Casciola Rosen, L. A.; Miller, D. K.; Anhalt, G. J. und Rosen, A. (1994): Specific cleavage of the 70-kDa protein component of the U1 small nuclear ribonucleoprotein is a characteristic biochemical feature of apoptotic cell death, *J Biol Chem* (Band 269), Nr. 49, Seite 30757-60.
 - [135] Boise, L. H. und Thompson, C. B. (1997): Bcl-x(L) can inhibit apoptosis in cells that have undergone Fas-induced protease activation, *Proc Natl Acad Sci U S A* (Band 94), Nr. 8, Seite 3759-64.
 - [136] Utz, P. J.; Hottelet, M.; Schur, P. H. und Anderson, P. (1997): Proteins phosphorylated during stress-induced apoptosis are common targets for autoantibody

-
- production in patients with systemic lupus erythematosus, *J Exp Med* (Band 185), Nr. 5, Seite 843-54.
- [137] Boise, L. H.; Gottschalk, A. R.; Quintans, J. und Thompson, C. B. (1995): Bcl-2 and Bcl-2-related proteins in apoptosis regulation, *Curr Top Microbiol Immunol* (Band 200), Seite 107-21.
- [138] Screatton, G. R.; Xu, X. N.; Olsen, A. L.; Cowper, A. E.; Tan, R.; McMichael, A. J. und Bell, J. I. (1997): LARD: a new lymphoid-specific death domain containing receptor regulated by alternative pre-mRNA splicing, *Proc Natl Acad Sci U S A* (Band 94), Nr. 9, Seite 4615-9.
- [139] Shaham, S. und Horvitz, H. R. (1996): An alternatively spliced *C. elegans* ced-4 RNA encodes a novel cell death inhibitor, *Cell* (Band 86), Nr. 2, Seite 201-8.
- [140] Wang, L.; Miura, M.; Bergeron, L.; Zhu, H. und Yuan, J. (1994): Ich-1, an Ice/ced-3-related gene, encodes both positive and negative regulators of programmed cell death., *Cell* (Band 78), Seite 739-50.

ANHANG

mRNA- und Protein-Sequenz von IL-4R α /IL-4R α IT

mRNA-Sequenz der IL-4R α -Kette nach Idzerda *et al.* [124]. Die Sequenzen der in der Arbeit verwendeten Primer sind unterstrichen, weitere wichtige Motive sind gekennzeichnet.

ggcgaatggagcagggcgcgagataattaaagatt	37
tacacacagctggaagaaatcatagagaagccgggcgtggtggctcatgcctataatcccagcacttttggaggctgag	116
gcgggcagatcacttgagatcaggagttcgagaccagcctggtgccttggcatctccca	210
atg ggg tgg ctt tgc	5
Met Gly Trp Leu Cys	
Signalpeptid	
tct ggg ctg ttc cct gtg agc tgc ctg gtc ctg ctg cag gtg gca agc tct ggg aac	250
Ser Gly Leu Leu Phe Pro Val Ser Cys Leu Val Leu Leu Gln Val Ala Ser Ser Gly Asn	25
atg aag gtc ttg cag gag ccc acc tgc gtc tcc gac tac atg agc atc tct act tgc gag	310
Met Lys Val Leu Gln Glu Pro Thr Cys Val Ser Asp Tyr Met Ser Ile Ser Thr Cys Glu	45
tgg aag atg aat ggt ccc acc aat tgc agc acc gag ctg cgc ctg ttg tac cag ctg gtt	370
Trp Lys Met Asn Gly Pro Thr Asn Cys Ser Thr Glu Leu Arg Leu Leu Tyr Gln Leu Val	65
ttt ctg ctg tcc gaa gcc cac acg tgt atc cct gag aac aac gga ggc gcg ggg tgc gtg	430
Phe Leu Leu Ser Glu Ala His Thr Cys Ile Pro Glu Asn Asn Gly Gly Ala Gly Cys Val	85
tgc cac ctg ctg atg gat gac gtg gtc agt gcg gat aac tat aca ctg gac ctg tgg gct	490
Cys His Leu Leu Met Asp Asp Val Val Ser Ala Asp Asn Tyr Thr Leu Asp Leu Trp Ala	105
ggg cag cag ctg ctg tgg aag ggc tcc ttc aag ccc agc gag cat gtg aaa ccc agg gcc	550
Gly Gln Gln Leu Leu Trp Lys Gly Ser Phe Lys Pro Ser Glu His Val Lys Pro Arg Ala	125
cca gga aac ctg aca gtt cac acc aat gtc tcc gac act ctg ctg ctg acc tgg agc aac	610
Pro Gly Asn Leu Thr Val His Thr Asn Val Ser Asp Thr Leu Leu Leu Thr Trp Ser Asn	145
ccg tat ccc cct gac aat tac ctg tat aat cat ctg acc tat gca gtc aac att tgg agt	670
Pro Tyr Pro Pro Asp Asn Tyr Leu Tyr Asn His Leu Thr Tyr Ala Val Asn Ile Trp Ser	165
gaa aac gac ccg gca gat ttc aga atc tat aac gtg acc tac cta gaa ccc tcc ctg cgc	730
Glu Asn Asp Pro Ala Asp Phe Arg Ile Tyr Asn Val Thr Tyr Leu Glu Pro Ser Leu Arg	185
atc gca gcc agc acc ctg aag tct ggg att tcc tac agg gca cgg gtg agg gcc tgg gct	790
Ile Ala Ala Ser Thr Leu Lys Ser Gly Ile Ser Tyr Arg Ala Arg Val Arg Ala Trp Ala	205
cag tgc tat aac acc acc tgg agt gag tgg agc ccc agc acc aag tgg cac aac tcc tac	850
Gln Cys Tyr Asn Thr Thr Trp Ser Glu Trp Ser Pro Ser Thr Lys Trp His Asn Ser Tyr	225
agg gag ccc ttc gag cag cac ctg ctg ctg ggc gtc agc gtt tcc tgc att gtc atc ctg	910
Arg Glu Pro Phe Glu Gln His Leu Leu Leu Gly Val Ser Val Ser Cys Ile Val Ile Leu	245
Homologie-	
gcc gtc tgc ctg ttg tgc tat gtc agc atc acc aag att aag aaa gaa tgg tgg gat cag	970
Ala Val Cys Leu Leu Cys Tyr Val Ser Ile Thr Lys Ile Lys Lys Glu Trp Trp Asp Gln	265
Box	
att ccc aac cca gcc cgc agc cgc ctg gtg gct ata ata atc cag gat gct cag ggg tca	1030
Ile Pro Asn Pro Ala Arg Ser Arg Leu Val Ala Ile Ile Ile Gln Asp Ala Gln Gly Ser	285
„Exon x“	
cag tgg gag aag cgg tcc cga ggc cag gaa cca gcc aag tgc cca cac tgg aag aat tgt	1090
Gln Trp Glu Lys Arg Ser Arg Gly Gln Glu Pro Ala Lys Cys Pro His Trp Lys Asn Cys	305
aca ctg gaa gaa ttg t	
→ Thr Leu Glu Glu Leu S	
ctt acc aag ctg ttg ccc tgt ttt ctg gag cac aac atg aaa agg gat gaa gat cct cac	1150
Leu Thr Lys Leu Leu Pro Cys Phe Leu Glu His Asn Met Lys Arg Asp Glu Asp Pro His	325
ct tac caa gct ctt gcc ctg ttt tct gga gca caa cat gaa aag gga tga	
er Tyr Gln Ala Leu Ala Leu Phe Ser Gly Ala Gln His Glu Lys Gly End	
geändertes C-terminales	
← Ende von IL-4R α IT	

aag	gct	gcc	aaa	gag	atg	cct	ttc	cag	ggc	tct	gga	aaa	tca	gca	tgg	tgc	cca	gtg	gag	1210
Lys	Ala	Ala	Lys	Glu	Met	Pro	Phe	Gln	Gly	Ser	Gly	Lys	Ser	Ala	Trp	Cys	Pro	Val	Glu	345
atc	agc	aag	aca	gtc	ctc	tgg	cca	gag	agc	atc	agc	gtg	gtg	cga	tgt	gtg	gag	ttg	ttt	1270
Ile	Ser	Lys	Thr	Val	Leu	Trp	Pro	Glu	Ser	Ile	Ser	Val	Val	Arg	Cys	Val	Glu	Leu	Phe	365
Glutaminsäurereiche Region																				
gag	gcc	ccg	gtg	gag	tgt	gag	gag	gag	gag	gta	gag	gaa	gaa	aaa	ggg	agc	ttc	tgt		1330
Glu	Ala	Pro	Val	Glu	Cys	Glu	Glu	Glu	Glu	Glu	Val	Glu	Glu	Glu	Lys	Gly	Ser	Phe	Cys	385
gca	tcg	cct	gag	agc	agc	agg	gat	gac	ttc	cag	gag	gga	agg	gag	ggc	att	gtg	gcc	cgg	1390
Leu	Thr	Glu	Ser	Leu	Phe	Leu	Asp	Leu	Leu	Gly	Glu	Glu	Asn	Gly	Gly	Phe	Cys	Gln	Gln	405
cta	aca	gag	agc	ctg	ttc	ctg	gac	ctg	ctc	gga	gag	gag	aat	ggg	ggc	ttt	tgc	cag	cag	1450
Ala	Ser	Pro	Glu	Ser	Ser	Arg	Asp	Asp	Phe	Gln	Glu	Gly	Arg	Glu	Gly	Ile	Val	Ala	Arg	425
gac	atg	ggg	gag	tca	tgc	ctt	ctt	cca	cct	tcg	gga	agt	acg	agt	gct	cac	atg	ccc	tgg	1510
Asp	Met	Gly	Glu	Ser	Cys	Leu	Leu	Pro	Pro	Ser	Gly	Ser	Thr	Ser	Ala	His	Met	Pro	Trp	445
gat	gag	ttc	cca	agt	gca	ggg	ccc	aag	gag	gca	cct	ccc	tgg	ggc	aag	gag	cag	cct	ctc	1570
Asp	Glu	Phe	Pro	Ser	Ala	Gly	Pro	Lys	Glu	Ala	Pro	Pro	Trp	Gly	Lys	Glu	Gln	Pro	Leu	465
cac	ctg	gag	cca	agt	cct	cct	gcc	agc	ccg	acc	cag	agt	cca	gac	aac	ctg	act	tgc	aca	1630
His	Leu	Glu	Pro	Ser	Pro	Pro	Ala	Ser	Pro	Thr	Gln	Ser	Pro	Asp	Asn	Leu	Thr	Cys	Thr	485
gag	acg	ccc	ctc	gtc	atc	gca	ggc	aac	cct	gct	tac	cgc	agc	ttc	agc	aac	tcc	ctg	agc	1690
Glu	Thr	Pro	Leu	Val	Ile	Ala	Gly	Asn	Pro	Ala	Tyr	Arg	Ser	Phe	Ser	Asn	Ser	Leu	Ser	505
cag	tca	ccg	tgt	ccc	aga	gag	ctg	ggt	cca	gac	cca	ctg	ctg	gcc	aga	cac	ctg	gag	gaa	1750
Gln	Ser	Pro	Cys	Pro	Arg	Glu	Leu	Gly	Pro	Asp	Pro	Leu	Leu	Ala	Arg	His	Leu	Glu	Glu	525
gta	gaa	ccc	gag	atg	ccc	tgt	gtc	ccc	cag	ctc	tct	gag	cca	acc	act	gtg	ccc	caa	cct	1810
Val	Glu	Pro	Glu	Met	Pro	Cys	Val	Pro	Gln	Leu	Ser	Glu	Pro	Thr	Thr	Val	Pro	Gln	Pro	545
gag	cca	gaa	acc	tgg	gag	cag	atc	ctc	cgc	cga	aat	gtc	ctc	cag	cat	ggg	gca	gct	gca	1870
Glu	Pro	Glu	Thr	Trp	Glu	Gln	Ile	Leu	Arg	Arg	Asn	Val	Leu	Gln	His	Gly	Ala	Ala	Ala	565
gcc	ccc	gtc	tcg	gcc	ccc	acc	agt	ggc	tat	cag	gag	ttt	gta	cat	gcg	gtg	gag	cag	ggt	1930
Ala	Pro	Val	Ser	Ala	Pro	Thr	Ser	Gly	Tyr	Gln	Glu	Phe	Val	His	Ala	Val	Glu	Gln	Gly	585
ggc	acc	cag	gcc	agt	gcg	gtg	gtg	ggc	ttg	ggt	ccc	cca	gga	gag	gct	ggt	tac	aag	gcc	1990
Gly	Thr	Gln	Ala	Ser	Ala	Val	Val	Gly	Leu	Gly	Pro	Pro	Gly	Glu	Ala	Gly	Tyr	Lys	Ala	605
ttc	tca	agc	ctg	ctt	gcc	agc	agt	gct	gtg	tcc	cca	gag	aaa	tgt	ggg	ttt	ggg	gct	agc	2050
Phe	Ser	Ser	Leu	Leu	Ala	Ser	Ser	Ala	Val	Ser	Pro	Glu	Lys	Cys	Gly	Phe	Gly	Ala	Ser	625
agt	ggg	gaa	gag	ggg	tat	aag	cct	ttc	caa	gac	ctc	att	cct	ggc	tgc	cct	ggg	gac	cct	2110
Ser	Gly	Glu	Glu	Gly	Tyr	Lys	Pro	Phe	Gln	Asp	Leu	Ile	Pro	Gly	Cys	Pro	Gly	Asp	Pro	645
gcc	cca	gtc	cct	gtc	ccc	ttg	ttc	acc	ttt	gga	ctg	gac	agg	gag	cca	cct	cgc	agt	ccg	2170
Ala	Pro	Val	Pro	Val	Pro	Leu	Phe	Thr	Phe	Gly	Leu	Asp	Arg	Glu	Pro	Pro	Arg	Ser	Pro	665
cag	agc	tca	cat	ctc	cca	agc	agc	tcc	cca	gag	cac	ctg	ggt	ctg	gag	ccg	ggg	gaa	aag	2230
Gln	Ser	Ser	His	Leu	Pro	Ser	Ser	Ser	Pro	Glu	His	Leu	Gly	Leu	Glu	Pro	Gly	Glu	Lys	685
gta	gag	gac	atg	cca	aag	ccc	cca	ctt	ccc	cag	gag	cag	gcc	aca	gac	ccc	ctt	gtg	gac	2290
Val	Glu	Asp	Met	Pro	Lys	Pro	Pro	Leu	Pro	Gln	Glu	Gln	Ala	Thr	Asp	Pro	Leu	Val	Asp	705
agc	ctg	ggc	agt	ggc	att	gtc	tac	tca	gcc	ctt	acc	tgc	cac	ctg	tgc	ggc	cac	ctg	aaa	2350
Ser	Leu	Gly	Ser	Gly	Ile	Val	Tyr	Ser	Ala	Leu	Thr	Cys	His	Leu	Cys	Gly	His	Leu	Lys	725
cag	tgt	cat	ggc	cag	gag	gat	ggt	ggc	cag	acc	cct	gtc	atg	gcc	agt	cct	tgc	tgt	ggc	2410
Gln	Cys	His	Gly	Gln	Glu	Asp	Gly	Gly	Gln	Thr	Pro	Val	Met	Ala	Ser	Pro	Cys	Cys	Gly	745
tgc	tgc	tgt	gga	gac	agg	tcc	tcg	ccc	cct	aca	acc	ccc	ctg	agg	gcc	cca	gac	ccc	tct	2470
Cys	Cys	Cys	Gly	Asp	Arg	Ser	Ser	Pro	Pro	Thr	Thr	Pro	Leu	Arg	Ala	Pro	Asp	Pro	Ser	765
cca	ggt	ggg	ggt	cca	ctg	gag	gcc	agt	ctg	tgt	ccg	gcc	tcc	ctg	gca	ccc	tcg	ggc	atc	2530

Pro Gly Gly Val Pro Leu Glu Ala Ser Leu Cys Pro Ala Ser Leu Ala Pro Ser Gly Ile	785
tca gag aag agt aaa tcc tca tca tcc ttc cat cct gcc cct ggc aat gct cag agc tca	2590
Ser Glu Lys Ser Lys Ser Ser Ser Ser Phe His Pro Ala Pro Gly Asn Ala Gln Ser Ser	805
agc cag acc ccc aaa atc gtg aac ttt gtc tcc gtg gga ccc aca tac atg agg gtc tct	2650
Ser Gln Thr Pro Lys Ile Val Asn Phe Val Ser Val Gly Pro Thr <u>Tyr</u> Met Arg Val Ser	825

taggtgcatg tcctcttggt gctgagtctg cagatgagga ctagggctta tccatgcctg 2710

End

ggaaatgcca cctcctggaa ggcagccagg ctggcagatt tccaaaagac ttgaagaacc 2770

atgggtatgaa ggtgattggc ccactgacg ttggcctaac actgggctgc agagactgga 2830

ccccgcccag cattgggctg ggctcgccac atcccatgag agtagagggc actgggtcgc 2890

cgtgccccac ggcaggcccc tgcaggaaaa ctgaggccct tgggcacctc gacttgtgaa 2950

cgagttgttg gctgctccct ccacagcttc tgcagcagac tgtccctgtt gtaactgccc 3010

aaggcatgtt ttgccacca gatcatggcc cacgtggagg ccacctgcc tctgtctcac 3070

tgaactagaa gccgagccta gaaactaaca cagccatcaa gggaatgact tgggcggcct 3130

tgggaaatcg atgagaaatt gaacttcagg gagggtggtc attgcctaga ggtgctcatt 3190

catttaacag agcttcctta ggttgatgct ggaggcagaa tcccggctgt caaggggtgt 3250

tcagttaagg ggagcaacag aggacatgaa aaattgctat gactaaagca gggacaattt 3310

gctgccaaac acccatgcc agctgtatgg ctgggggctc ctctgtatgca tggaaacccc 3370

agaataaata tgctcagcca ccctgtgggc cgggcaatcc agacagcagg cataaggcac 3430

cagttaccct gcatgttggc ccagacctca ggtgctaggg aaggcgggaa ccttgggttg 3490

agtaatgctc gtctgtgtgt tttagtttca tcacctgtta tctgtgtttg ctgaggagag 3550

tggaaacagaa ggggtggagt tttgtataaa taaagtttct ttgtctc 3597

Lebenslauf

Persönliche Angaben

Name	Anja Möricke
Wohnort	Kapellenstr. 12 30625 Hannover Tel.: 0511-5510378
Geburtstag/-ort	13. August 1968 in Berlin

Schulbildung

1974-78	Besuch der Paul-Schneider-Grundschule in Berlin-Steglitz
1978-87	Besuch des Gymnasium Steglitz in Berlin-Steglitz
11.07.1987	Abitur

Berufsausbildung

1987-1989	Studium im Fach Musikwissenschaften an der Freien Universität Berlin
WS 1989/90 - SS 1995	Studium der Humanmedizin an der Freien Universität Berlin
WS 1995/96	Weiterführung des Studiums der Humanmedizin an der Humboldt-Universität Berlin
26.08.1993	1. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung vor dem LPA Berlin
21.03.1995	2. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung vor dem LPA Berlin
04/1995 - 02/1996	Praktisches Jahr in den Abteilungen Innere Medizin (Internistische Notaufnahme, Hämatologie/Onkologie), Chirurgie (Chirurgische Notaufnahme, Allgemeinchirurgie) und Pädiatrie
09.05.1996	3. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung vor dem LPA Berlin
WS 1996/97 - SS 1998	Promotionsstudiengang an der Humboldt-Universität Berlin
09/1998 - 04/2000	Ärztin im Praktikum in der Kinderklinik der Medizinischen Hochschule Hannover
seit 05/2000	Assistenzärztin der Abteilung pädiatrische Onkologie/Hämatologie in der Kinderklinik der Medizinischen Hochschule Hannover

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn Dr. Karl Seeger für die großartige Betreuung. Mit Engagement, fundierter Sachkenntnis und stetiger Bereitschaft zur Diskussion hat er sich stets meiner fachlichen Probleme angenommen und mir über alle Phasen des Zweifels hinweggeholfen.

Herrn Prof. Dr. G. Henze danke ich für die Überlassung des Themas und sein Interesse am Fortgang dieser Arbeit.

Ich bedanke mich bei meinen Eltern, die mir das Studium ermöglichten und mir mit ihrer aufmunternden Unterstützung in allen schwierigen Phasen dieser Arbeit beistanden.

Ich danke der Kind-Philipp-Stiftung für Leukämieforschung e.V. für die finanzielle Unterstützung durch ein Promotionsstipendium.

Außerdem bedanke ich mich bei den Mitarbeitern unseres Labors, ohne deren Mithilfe diese Arbeit nicht hätte entstehen können:

Unseren MTAs Claudia Hanel, Lucia Badiali, Gabriele Körner und Gisela Götze für die Aufarbeitung der Patientenmaterialien und ihre bereitwillige Unterstützung bei allen praktischen Fragen.

Gabriele Körner und Christian Kebelmann-Betzing, denen die zusätzliche Bande in der PCR des IL-4R α bei eigenen Arbeiten erstmals aufgefallen ist und die mir außerdem die Primer für die PCRs von IL-15 und γ_C zur Verfügung stellten.

Lucia Badiali, die eine unersetzliche Hilfe bei allen Problemen der Durchflußzytometrie und Zellkultivierung war.

Serge Dragon, der mich in die Methodik des Sequenzierens einwies.

Tobias Reindl, der mit mir die SSCP zum Nachweis der Heteroduplexe durchführte.

Oliver Fahron für seine Hilfe insbesondere bei Computerproblemen und statistischen Fragestellungen.

Margaritta Petterson, die mir ihre reichhaltige Erfahrung vor allem bei den Zellproliferationsassays und der Durchflußzytometrie zur Verfügung stellte.

Birgit Beyermann für ihre Hilfe bei methodischen Problemen.

Tillmann Taube und Alexander Korte für die Überlassung der Primer für die PCRs von β_C , IL-7 und IL-7R.

Allen oben erwähnten und außerdem meinen weiteren Mitdoktoranden Anita Peter, Dirk Buchwald, Clemens Tillmann, Hagen v. Einsiedel und Michael Pogodda, die mir stets mit Rat und Tat zur Seite standen.

Erklärung an Eides Statt

Hiermit erkläre ich, daß die Dissertation von mir selbst ohne die unzulässige Hilfe Dritter verfaßt wurde, auch in Teilen keine Kopie anderer Arbeiten darstellt und die benutzten Hilfsmittel sowie die Literatur vollständig angegeben sind.

Anja Möricke